

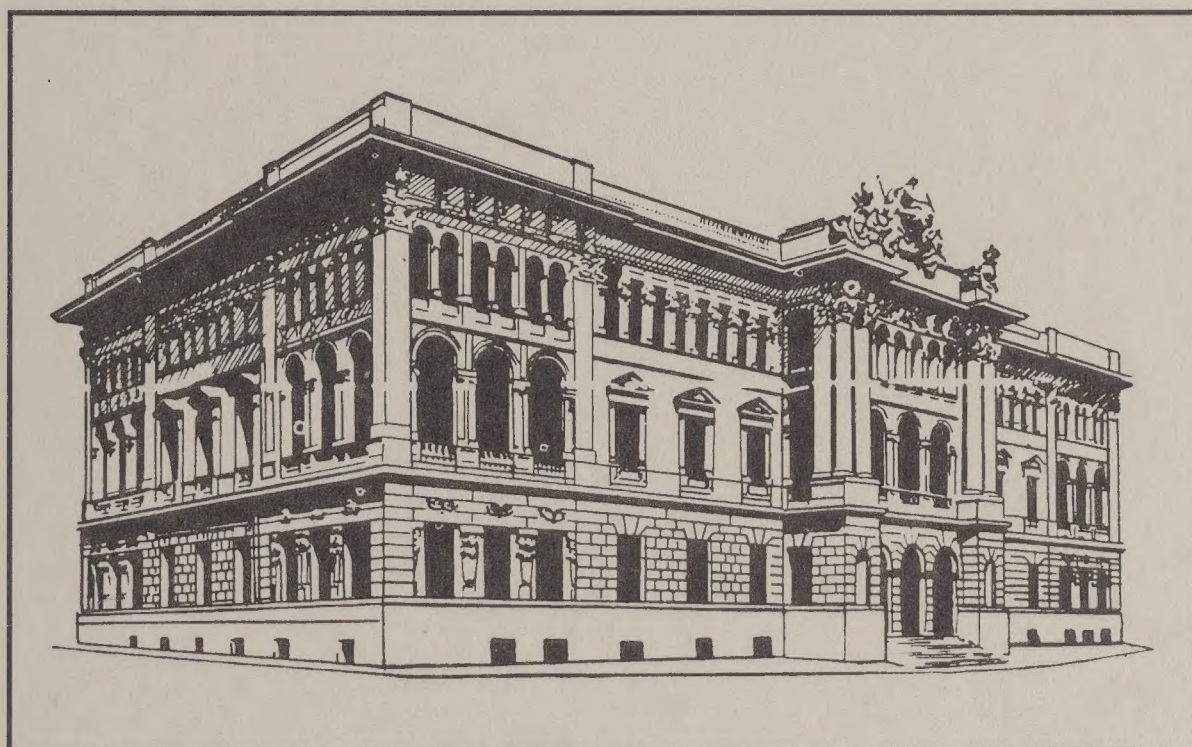
QH
7
G3X
NH

ISSN 0365-4389

ANNALI DEL MUSEO CIVICO
DI
STORIA NATURALE

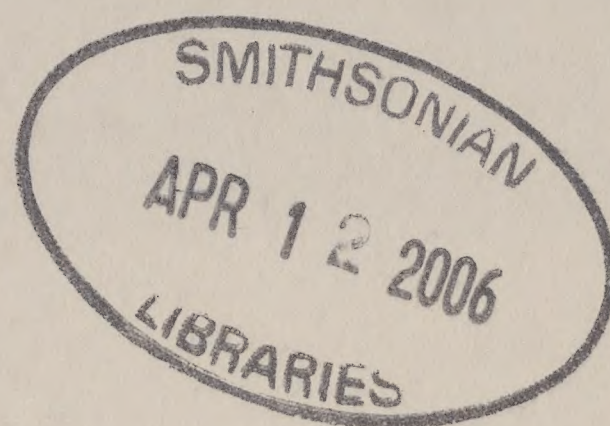
“GIACOMO DORIA,,

PUBBLICATI PER CURA DI R. POGGI



VOLUME XCVII

GENOVA
ERREDI GRAFICHE EDITORIALI
2005



MUSEO CIVICO DI STORIA NATURALE

« GIACOMO DORIA »

VIA BRIGATA LIGURIA, 9 - 16121 GENOVA

PERSONALE SCIENTIFICO

Direttore - Dott. ROBERTO POGGI

Conservatore - Dott. GIULIANO DORIA

CONSERVATORI ONORARI

Dr.ssa GIANNA ARBOCCO - Zoologia

Dr.ssa LILIA CAPOCACCIA - Zoologia

Prof. MARIO GALLI - Mineralogia

Sig. CARLO GALUPPO - Ornitologia

Prof. SALVATORE GENTILE - Botanica

Prof. SANDRO RUFFO - Zoologia

Prof. MICHELE SARÀ - Zoologia

Gli articoli pubblicati sugli *Annali del Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria"* sono citati e recensiti sui principali repertori bibliografici, tra cui: Zoological Record, BIOSIS Previews, Biological Abstracts, Abstracts of Entomology, CAB Abstracts, Review of Agricultural Entomology, Review of Medical and Veterinary Entomology.

The papers published in the *Annali del Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria"* are abstracted and indexed in the main bibliographic records, such as: Zoological Record, BIOSIS Previews, Biological Abstracts, Abstracts of Entomology, CAB Abstracts, Review of Agricultural Entomology, Review of Medical and Veterinary Entomology.

Si vedano nella 3^a pagina di copertina le norme per gli Autori

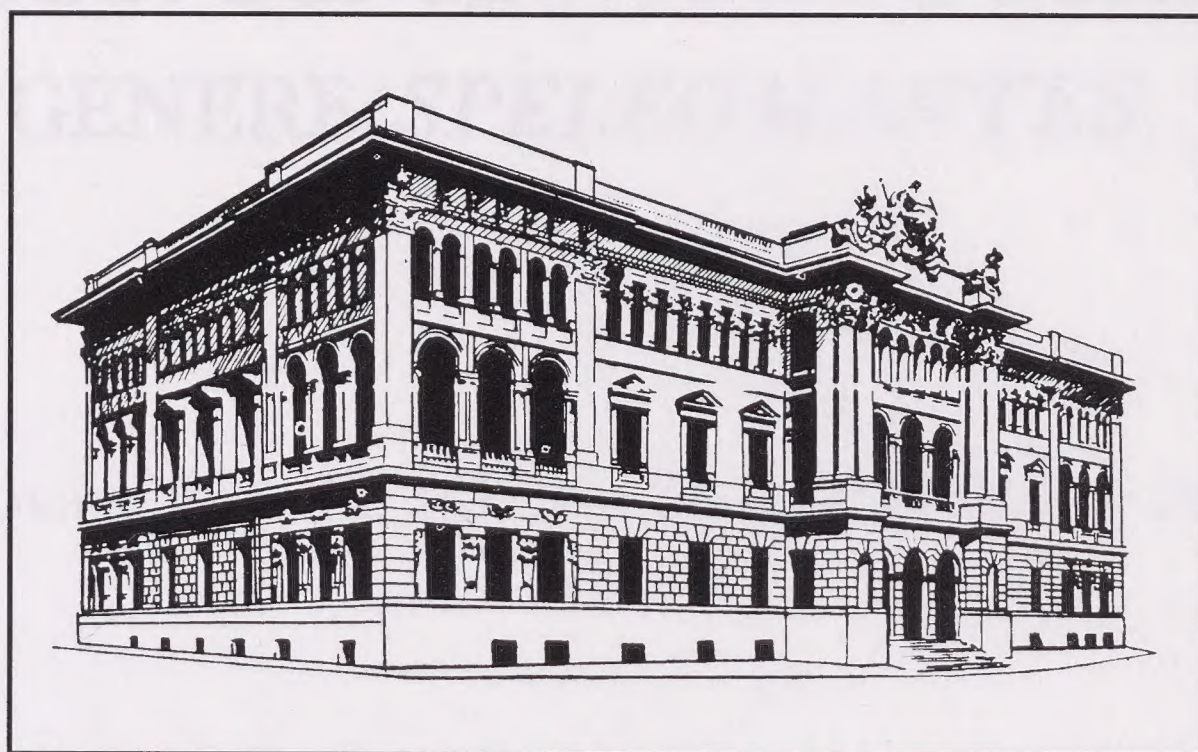
ANNALI DEL MUSEO CIVICO
DI
STORIA NATURALE
“GIACOMO DORIA”

Volume XCVII

ANNALI DEL MUSEO CIVICO
DI
STORIA NATURALE

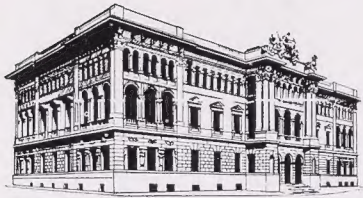
“GIACOMO DORIA,”

PUBBLICATI PER CURA DI R. POGGI



VOLUME XCVII

GENOVA
ERREDI GRAFICHE EDITORIALI
2005



Museo Civico
di Storia Naturale
"G. Doria" - Genova



Gruppo Speleologico Ligure
"ARTURO ISSEL"
70° ANNIVERSARIO DELLA FONDAZIONE
(1932-2002)



DIP.TE.RIS
Università di
Genova

ATTI DEL
PRIMO CONVEGNO NAZIONALE
BIOLOGIA DEI GEOTRITONI EUROPEI.
GENERE *SPELEOMANTES*

Genova e Busalla (GE) - 26 e 27 ottobre 2002

A cura di

Sebastiano Salvidio, Roberto Poggi, Giuliano Doria
& Mauro Valerio Pastorino

Genova, 2005

COMITATO ORGANIZZATORE

Gruppo Speleologico Ligure "Arturo Issel"

Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria" - Genova

DIP.TE.RIS. - Università di Genova

COMITATO SCIENTIFICO

Prof. Benedetto Lanza (Presidente)

Prof. Augusto Ambrosi

Dott.ssa Rossana Brizzi

Dott. Giuliano Doria

Dott. Mauro Valerio Pastorino

Dott. Roberto Poggi

Dott. Sebastiano Salvidio

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

Dott. Fabrizio Oneto

Dott. Mauro Valerio Pastorino

Dott. Sebastiano Salvidio

CON IL CONTRIBUTO DI:

Regione Liguria - Assessorato Tutela del Territorio
Provincia di Genova - Assessorato al Patrimonio Culturale del Territorio
Ente Parco Antola
Comunità Montana Alta Valle Scrivia
Comune di Busalla

CON IL PATROCINIO DI:

Regione Liguria
Regione Piemonte
Provincia di Genova
Comune di Genova
Ente Parco Antola
Comunità Montana Alta Valle Scrivia
Comune di Busalla
Federazione Speleologica della Toscana
Societas Herpetologica Italica
Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Genova

PREFAZIONE DEI CURATORI

Questo volume, edito all'interno della serie degli *Annali del Museo civico di Storia naturale "Giacomo Doria"*, raccoglie la maggior parte dei lavori presentati al "Primo convegno nazionale sulla biologia dei geotritoni europei - genere *Speleomantes*" svoltosi sabato 26 e domenica 27 ottobre 2002 a Genova e a Busalla (GE).

Al Convegno sono state presentate, insieme al saluto introduttivo di Benedetto Lanza, Presidente del Comitato Scientifico, a quello di Mauro Valerio Pastorino, Presidente del Gruppo Speleologico Ligure "Arturo Issel", e al ricordo della figura di Issel da parte di Roberto Poggi, Direttore del Museo "G. Doria", 16 comunicazioni scientifiche di argomenti assai diversi: biogeografia (1), sistematica (2), genetica di popolazioni (3), fisiologia (1), parassitologia (1) ed ecologia (8) intesa nel senso più ampio del termine. Nonostante le differenti tematiche trattate, nessun contributo ha riguardato l'etologia nel senso letterale del termine o la conservazione delle popolazioni di geotritone; questi argomenti sono per ora piuttosto trascurati dagli specialisti ma costituiscono temi sicuramente meritevoli di considerazione e che in futuro rappresenteranno linee di ricerca particolarmente interessanti.

Alcuni testi in esteso di lavori presentati al Convegno non sono giunti ai curatori del presente volume e pertanto non sono stati pubblicati; di essi rimane comunque traccia nel fascicolo "Programma e Riassunti" riprodotto dal Centro Stampa del DIP.TE.RIS. e depositato presso la Biblioteca del Museo "G. Doria" e presso il Centro Servizi Bibliotecari - Biologia, Scienze della Terra e del Mare (CSB - BSTM) dell'Università di Genova. Il fascicolo completo può comunque essere scaricato gratuitamente dal sito della *Societas Herpetologica Italica* (www.unipv.it/webshi/) che è stata fra i patrocinatori dell'iniziativa.

Al Convegno hanno partecipato numerosi specialisti provenienti

dall'Italia e dalla Repubblica di San Marino, personale di Enti di vigilanza, studenti dell'Università di Genova e delle scuole superiori di Busalla, speleologi e semplici appassionati di anfibi o di storia naturale. L'affluenza ha superato le più ottimistiche previsioni degli organizzatori: i partecipanti sono stati 75 durante la prima seduta del 26 ottobre svoltasi nell'anfiteatro del Museo "G. Doria" e 34 durante la seconda, tenutasi il giorno successivo a Villa Borzino. In totale 84 persone hanno preso parte alle due giornate di studio: non poche per un convegno interamente dedicato ai geotritoni, animali di enorme interesse scientifico, ma pur sempre organismi a sangue freddo poco noti al grande pubblico.

Tra le attività collegate al Convegno ci piace ricordare in modo particolare la visita serale alla ristrutturata Stazione Biospeleologica di S. Bartolomeo di Savignone, l'unico laboratorio sotterraneo interamente dedicato allo studio della biologia dei geotritoni nel loro ambiente naturale. In questo sito hanno svolto la tesi di laurea alcuni studenti di Scienze naturali e, negli anni, sono state condotte ricerche di livello internazionale che hanno fatto conoscere il Gruppo "Issel" anche al di fuori dei confini nazionali. La messa in sicurezza dell'entrata, effettuata dal Servizio Mobilità della Provincia di Genova, garantirà la continuazione delle ricerche sugli *Speleomantes* e permetterà alla Stazione di diventare un centro facilmente visitabile dal pubblico.

Infine pensiamo che il Convegno abbia rappresentato un'importante occasione di incontro e di conoscenza, anche personale, e ci auguriamo che tali occasioni possano ripetersi in futuro.

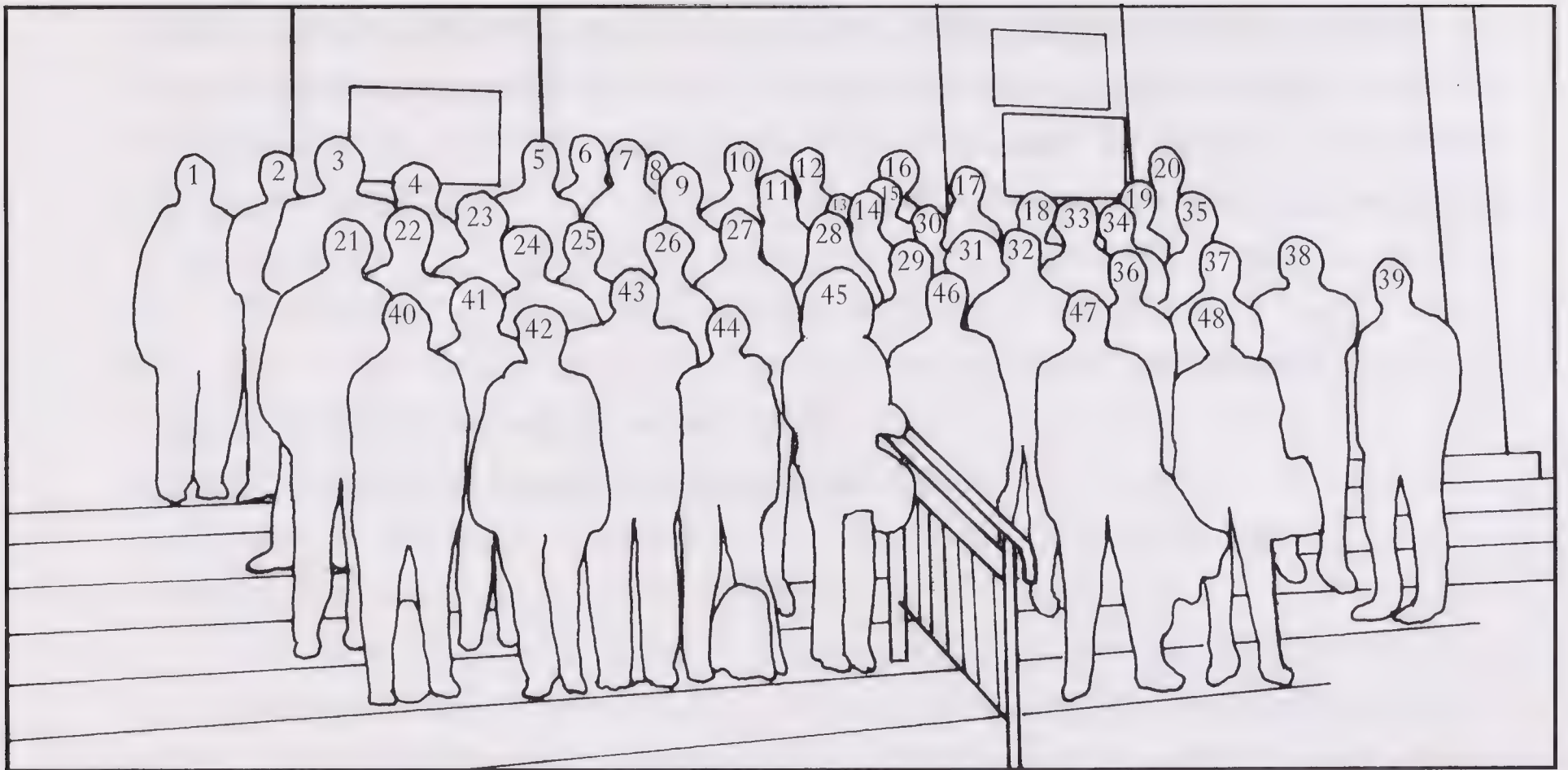
Ringraziamo gli Enti che hanno concesso contributi e patrocini e tutti i partecipanti, assieme ai quali abbiamo trascorso due intense giornate di studio.

Infine ci fa piacere ricordare con gratitudine anche gli esperti che ci hanno aiutato a revisionare criticamente i manoscritti dei testi pubblicati in questo volume, dedicando al Convegno parte del loro tempo: Anna Bonardi (Milano), Augusto Gentili (Milano), Lia Paggi (Roma), Edoardo Razzetti (Pavia), Gennaro Salvidio (Genova), Francesca Viazzi (Genova) e David Wake (Berkeley).

Il primo Convegno sulla biologia dei geotritoni resterà nella memoria degli organizzatori come un “grande” piccolo evento; speriamo che anche la sua traccia possa conservarsi a lungo con la materia cartacea di questo volume.

Genova, settembre 2005

*Sebastiano Salvidio, Roberto Poggi,
Giuliano Doria & Mauro Valerio Pastorino*



- | | |
|-----------------------------|--------------------------|
| 1. Marco Scarel | 25. Chiara Benvenuto |
| 2. Giulio Gardini | 26. Alessandra Lanza |
| 3. Riccardo Cattaneo Vietti | 27. Riccardo Jesu |
| 4. Augusto Gentili | 28. Roberta Piombo |
| 5. Francesco Surace | 29. Dario Ottonello |
| 6. Régis Martin | 30. Mara Calvinì |
| 7. Mauro Valerio Pastorino | 31. Alessandra Ruggi |
| 8. Giuliano Doria | 32. Fabrizio Oneto |
| 9. Lorenzo Repetto | 33. ? |
| 10. Enrico Buriola | 34. Franco Bernini |
| 11. Luca Lamagni | 35. Massimo Delfino |
| 12. Mirko Ferretti | 36. Raul Manenti |
| 13. Alessandra Pontremolesi | 37. Christian Pastorelli |
| 14. Fabio Lento | 38. Paolo Laghi |
| 15. ? | 39. Sandro Casali |
| 16. Giorgio Tarditi | 40. Anna Sanna |
| 17. ? | 41. Bianca Maria Uva |
| 18. Anna Bonardi | 42. Roberta Cimmaruta |
| 19. Roberto Sindaco | 43. Bettino Lanza |
| 20. Edoardo Razzetti | 44. Sara Rivero |
| 21. Ezio Musante | 45. Maria Luisa Tavano |
| 22. Roberto Poggi | 46. Sebastiano Salvidio |
| 23. Paola Giorgio Lanza | 47. Massimo Gigante |
| 24. Lilia Capocaccia Orsini | 48. Federico Melodia |



Foto di gruppo di alcuni dei partecipanti al convegno, sulla scalinata d'ingresso del Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria", Genova, 26.X.2002.

SOMMARIO

	Pag.
LANZA B. - Prolusione.	17-18
LANZA B. - Opening Speech.	19-20
PASTORINO M. V. - Gruppo "Issel": ideali e storia.....	21-30
POGGI R. - La figura di Arturo Issel (1842-1922).	31-37
POGGI R. - Note d'archivio sulla fondazione del Gruppo "Issel".	39-43
DELFINO M., RAZZETTI E. & SALVIDIO S. - European Plethodontids: palaeontological data and biogeographical considerations (Amphibia).....	45-58
LANZA B., CIMMARUTA R., FORTI G., BULLINI L. & NASCETTI G. - Bianchi's cave salamander, <i>Speleomantes ambrosii</i> <i>bianchii</i> n. ssp. (Amphibia, Caudata, Plethodontidae).	59-77
BURIOLA E., PASTORINO M. V. & BONA F. - Res Ligusticae CCXLVII. <i>Distoichometra italica</i> n. sp. (Cestoda, Nema- totaeniidae) parassita del geotritone europeo <i>Speleomantes</i> <i>strinatii</i> (Aellen, 1958) in Liguria.....	79-97
UVA B. M., STURLA M. & MASINI M. A. - Kidney and osmo- regulation in <i>Speleomantes genei</i> (Temminck & Schlegel, 1838) (Amphibia, Plethodontidae).	99-107
CIMMARUTA R., FORTI G., LANZA B. & NASCETTI G. - Res Ligusticae CCXLVIII. The effects of Quaternary glaciations on the genetic structure of <i>Speleomantes</i> <i>strinatii</i> (Aellen, 1958) (Amphibia, Plethodontidae).	109-121
FORTI G., LANZA B., CIMMARUTA R. & NASCETTI G. - An ex- periment of artificial syntopy <i>ex situ</i> between <i>Speleoman-</i> <i>tes italicus</i> (Dunn, 1923) and <i>S. ambrosii ambrosii</i> (Lanza, 1955) (Amphibia, Plethodontidae).	123-133

RUGGI A., CIMMARUTA R., FORTI G. & NASCETTI G. - Preliminary study of a hybrid zone between <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923) and <i>S. ambrosii</i> (Lanza, 1955) on the Apuane Alps, using RFLP analysis (Amphibia, Plethodontidae).	135-144
CASALI S., SUZZI VALLI A., BUSIGNANI G. & TEDALDI G. - I costumi arboricoli di <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923) nella Repubblica di San Marino (Amphibia, Plethodontidae).	145-152
LAGHI P., PASTORELLI C. & SCARAVELLI D. - Individual pattern recognition of <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923) (Amphibia, Plethodontidae).	153-160
ONETO F. & SALVIDIO S. - Res Ligusticae CCXLIX. Dati preliminari sulla distribuzione delle prede di <i>Speleomantes strinatii</i> (Aellen, 1958) nella Stazione Biospeleologica di S. Bartolomeo (GE) (Amphibia, Plethodontidae).	161-168
PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D. - Spacing of <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923): application of a Geographic Information System (G.I.S.) (Amphibia, Plethodontidae).	169-177
FORTI G., CIMMARUTA R. & NASCETTI G. - Behavioural responses to seasonal variations of autoecological parameters in populations of <i>Speleomantes strinatii</i> (Aellen, 1958) and <i>S. ambrosii</i> (Lanza, 1955) (Amphibia, Plethodontidae).	179-192

PROLUSIONE

C'era una volta ... «un Re !» direte voi. No, sbagliate. C'era una volta ... «un pezzo di legno !» Nemmeno ! C'era una volta, in una fitta siepe di Boboli (a Firenze), una grata di accesso al sistema di drenaggio del giardino una cui sbarra era piegata abbastanza da permettere al sottoscritto, allora filiforme ginnasiale dodicenne, di fare nel lontano 1936 le sue prime esperienze ipogee e di fondare la “Banda del Buco”.

Erano tempi duri. Le condizioni economiche generali non erano floride e gli spostamenti, anche modesti, non erano facili: per i più, una bicicletta era allora quasi altrettanto irraggiungibile di una Ferrari al tempo d'oggi. Fu così che soltanto cinque anni più tardi, il 16 settembre 1941, riuscii finalmente a realizzare il mio sogno di esplorare una vera grotta, precisamente la Spelonca delle Pille sui Monti della Calvana, tra Prato e Firenze, il numero 1 della mia vita e, guarda caso, anche il numero 1 del catasto speleologico toscano ... E fu proprio lì che ebbi il *coup de foudre* per i geotritoni, inizio di una infatuazione travolgente per quelli che, stante le loro caratteristiche complessive, possono forse esser considerati i Vertebrati più interessanti d'Europa.

Essendo io fedele per natura, la mia passione si trasformò ben presto in amore e nacquero così i primi frutti: lavori forse abbastanza ingenui, sì, ma che rappresentarono l'inizio di ben più complesse ricerche sull'argomento, destinate a dare risultati di indubbio interesse nei campi della genetica, dell'evoluzionismo, della sistematica, della tassonomia, della parassitologia, dell'ecologia, dell'etologia e della dinamica di popolazione.

Mi piace pensare che probabilmente questo congresso non avrebbe avuto luogo se la sbarra di una grata del Giardino di Boboli fosse stata indenne: «*Das Schicksal mischt die Karten, und wir spielen*», «La sorte mischia le carte e noi giochiamo» ha scritto Schopenhauer.

Ma soprattutto mi rallegra il fatto che gli amici genovesi abbiano

avuto la splendida idea di abbinare le celebrazioni per il 70° anniversario della fondazione del glorioso *Gruppo Speleologico Ligure "Arturo Issel"* a questo nostro convegno sui geotritoni, bestioline che, come noi, hanno per le grotte un *feeling* particolare. Devo a questi amici se -ormai assai in là sul viale del tramonto, ma circondato da tanti giovani, appassionati e valorosi naturalisti- sento rinverdire in me due delle maggiori passioni della mia vita: la biospeleologia e l'erpetologia.

Pertanto è veramente di cuore che, anche a nome dei presenti, ringrazio gli ideatori e gli organizzatori di questo congresso, insieme a tutti coloro che hanno collaborato alla sua brillante realizzazione.

Cari amici e colleghi genovesi: grazie, grazie e ancora mille volte grazie!

Benedetto Lanza

OPENING SPEECH

Once upon a time there was ... «A king !» my readers will say immediately. No, you are mistaken. Once upon a time there was ... «A piece of wood !» Not even that ! Once upon a time, in a thick hedge in Boboli Gardens (at Florence) there was a grate, covering the entry of the drainage system, with a bar bent enough to allow me, a filiform twelve-year-old gymnasial student, to make my first underground experiences and to found the “Banda del Buco”¹ in the far-off 1936’s.

Those were hard times and it was not easy make ends meet. Then, even short trips were not easy for most people: even a bike was almost as unaffordable as a Ferrari is today. Thus, it was only five years later, on the 16th of September 1941, I finally made my dream of exploring a real cave come true, precisely the *Spelonca delle Pille* on the Calvana Mountains, between Prato and Florence. It was number 1 of my life and, as it happens, also number 1 in the Tuscan speleological cadastre ... And it was there that I had my *coup de foudre* for European cave salamanders. It was the very beginning of an overwhelming infatuation with those that are likely to be considered, according to their overall characteristics, the most interesting vertebrates in Europe.

Since I am by nature a faithful person, my passion soon turned into love producing its first fruits: perhaps rather naïve works, which, however, were the beginning of more complex studies on this subject which eventually were to produce interesting results in the fields of genetics, evolutionism, systematics, taxonomy, parasitology, ecology, ethology, and population dynamics.

I like to think that this conference probably wouldn’t take place if a bar of a grate in Boboli Gardens hadn’t been damaged: «*Das*

¹ “Banda del Buco”, literally “Band of the Hole”, refers to a gang of thieves notorious for making holes in the walls or digging galleries.

Schicksal mischt die Karten, und wir spielen», «Fate shuffles cards and we play», as Schopenhauer wrote.

But, above all, I am really pleased that our Genoese friends had the wonderful idea of joining the celebration for the 70th anniversary of the foundation of the glorious *Gruppo Speleologico Ligure "Arturo Issel"* with this conference on cave salamanders, little beasts sharing with us the same special feeling for caves. Although I have already gone quite a way along the sunset boulevard -but always supported by many young, passionate and valid naturalists-, I owe to these friends the greening again of two of the biggest passions of my life: biospeleology and herpetology.

Therefore, also on behalf of all the participants, with all my heart I thank the devisers and organizers of the meeting, as well as all the others who collaborated for such a brilliant accomplishment.

Dear Genoese friends and colleagues: thank you, thank you very much once again!

Benedetto Lanza

MAURO VALERIO PASTORINO*

GRUPPO “ISSEL”: IDEALI E STORIA¹

Cari amici,

prima di ogni altra cosa, grazie. Grazie di vero cuore.

La vostra presenza che ci onora, qui, nell'anfiteatro di questo Museo in cui ha avuto la sua prima sede il Gruppo Speleologico Ligure “Arturo Issel”, e in cui ci accingiamo a festeggiare insieme a voi, con il Convegno Nazionale sui geotritoni, il nostro settantesimo anniversario di fondazione, è il regalo più bello in cui potessimo sperare, e ci aiuta a riempire di contenuti e di speranze un momento davvero esaltante della nostra storia associativa. Dirlo, può sembrare quasi scontato, e invece questa non è una frase fatta ma l'espressione fraterna dei nostri veri sentimenti e della nostra riconoscenza più sincera.

Un momento, peraltro, questo dei nostri per niente senili settant'anni, non del tutto facile per noi, in quanto se da una parte ci vede impegnati in un quasi frenetico concatenarsi e sovrapporsi di idee, progetti, ricerche, intuizioni scientifiche ed esplorative, dall'altra non ci può far dimenticare una realtà preoccupante, che noi continuiamo a considerare diretta conseguenza del fatto che la nostra visione “globale” della speleologia non coincide con gli indirizzi attualmente di moda in Italia nella pratica “gestionale” di questa particolare disciplina naturalistica.

È infatti proprio per il fatto di portare avanti concezioni di vita associativa considerate obsolete dai più, che noi ci troviamo ad essere in pochi, troppo pochi; talmente in pochi da nutrire seri dubbi che il Gruppo, pur così ideologicamente vitale, riesca a sopravviverci.

* Presidente del Gruppo Speleologico Ligure “Arturo Issel”

¹ Per non appesantire eccessivamente l'avvio del Convegno il mio saluto ai congressisti fu in realtà molto più rapido ed informale rispetto a questo testo, della cui pubblicazione sugli Atti i partecipanti vennero comunque informati direttamente.

A meno che, ovviamente, non vi sia nei prossimi anni l'inserimento di nuove presenze giovanili, motivate però dall'accettazione di un postulato per noi irrinunciabile: "il dissidio fra speleologia sportivo/esplorativa e speleologia scientifica non esiste: la speleologia è indissolubilmente e pariteticamente sport-esplorazione-scienza".

Prendere o lasciare: noi non siamo di quelli che cambiano il vino dentro la bottiglia, o se proprio dovessimo farlo, non saremmo mai disposti ad accettare che non ne venisse cambiata anche l'etichetta. In altre parole, siamo gli eredi di una storia, e insieme di una proposta: a questa storia e a questa proposta continuiamo a credere dopo settant'anni e quindi non vogliamo tradirle per alcun motivo. Meglio chiudere che cambiare, ma noi chiudere non vorremmo proprio, e la convocazione di questo Convegno ne è la prova concreta e significativa.

A questo punto, accenniamolo dunque brevemente il racconto di queste virtù originali che tanto continuano ad affascinarci; non vi parlerò quindi della nostra storia più recente, pur densa di attività, scoperte, studi, esplorazioni, battaglie civili, che può essere datata pressapoco a partire dalla seconda metà degli anni '60 e che è per noi ancora cronaca, essendo stata vissuta in prima persona da chi vi parla: ci vorrebbe troppo tempo, e voi siete qui per un incontro di alto livello scientifico e non per assistere ad un'autocelebrazione. No, la storia che vi voglio per sommi capi raccontare è quella delle nostre origini, e per farlo mi limiterò soprattutto a riportarvi, quasi pari passo, ciò che ne disse il nostro caro ex Presidente Ing. Enzo E. Coddé, nel corso del Convegno-Assemblea di Finale Ligure del 1960 in occasione del 10° anniversario di fondazione della Società Speleologica Italiana.²

Vi dirò subito che in Liguria la storia della Speleologia è molto più antica di quella del Gruppo "Issel", che pure è, per data di nascita, il primo Gruppo Speleologico della Regione. Senza andare troppo indietro, vale a dire fino al secolo XVIII con le prime osservazioni di Spallanzani e di altri studiosi (neanche a farlo apposta, in un'area dello spezzino che è attualmente sede di nostre importanti

² Attività del Gruppo Speleologico "Issel" sino all'anno 1955 - *Rass. spel. ital.*, Como, 1962, XIV (2): 118-120.

ricerche: quella sulla Sprugola di Zegori), mi basta ricordare con Coddé che nella seconda metà dell'Ottocento:

"...le ricerche speleologiche vennero intensificate in maniera sorprendente. Numerose furono le caverne che dalla Valle del Roja alla Valle del Magra furono meta di studi morfologici e geologici nonché di scavi sistematici che portarono al rinvenimento di interessantissimi materiali. Le scoperte faunistiche permisero la scoperta di importanti artropodi cavernicoli. Però una raccolta sistematica di dati riguardanti le grotte liguri si ebbe solo nel 1888 quando il Gestro con la sua memoria sugli *Anophthalmus* trovati in Liguria citò, con dati esatti, una sessantina di cavità liguri. Fu il primo esempio di catasto della speleologia ligure.

Quasi nello stesso periodo anche le grotte della provincia di La Spezia furono oggetto di studio e qui dobbiamo ricordare il Cappellini che, nella sua descrizione geologica dei dintorni di La Spezia e della Magra inferiore, fece un resoconto accurato dei suoi studi specialmente di preistoria.

Il primo lavoro di insieme delle grotte liguri è però del Bensa. In esso l'A., che era allora molto giovane, riunì tutti i dati principali delle grotte della Liguria e anche delle zone confinanti, specialmente delle Alpi Marittime, dando assieme alle notizie morfologiche, geologiche, e faunistiche anche una prima bibliografia."

C'erano state in quei decenni altre grandi avventure di studio e di ricerca, quali quella di Arturo Issel, il grande geologo al quale la speleologia ligure è debitrice a tal punto che quando si trattò di dare un nome alla neonata prima associazione speleologica ligure, quello di Issel sembrò il riferimento più preciso e quasi obbligato.

Dopo questa fiammata di interessi e di studi, una notevole spinta alla pratica speleologica si ebbe nuovamente nel secolo successivo, dopo la nascita, nel 1927, dell'Istituto Italiano di Speleologia di Postumia. Il Gruppo Issel venne appunto fondato in quel periodo, pochi anni dopo: nel 1932.

In tal modo anche in Liguria fu avviata "la ripresa dello studio sistematico e ordinato delle cavità naturali".

E proprio parlando di "Gruppo Issel", il fatto più singolare è che tra i suoi fondatori, fra cui si annoveravano studiosi del calibro di Brian, Capra, Doderò ecc., figuravano anche i nomi di Gestro e

di Bensa, che a fare speleologia avevano già cominciato tanti decenni prima, per cui appare evidente che quella fondazione si inseriva in un solco tracciato in anni molto più lontani, vale a dire nella seconda metà dell'Ottocento.

Non mi piacciono le falsificazioni e quindi non intendo certo retrodatare l'inizio della nostra storia: una cosa sono le ricerche di singoli studiosi ed altra la scoperta prima e poi la continuità del momento associativo: due dimensioni evidentemente diverse che non possono esser fatte artificialmente coincidere.

Ma lo spirito era quello, e non a caso, e cito ancora, venne ben presto “compilato un primo elenco delle grotte liguri sulla base dei dettami dell'Istituto di Speleologia di Postumia. Questo elenco comprendeva 118 cavità: fra le più importanti e note specialmente dal punto di vista paleontologico... È di questo periodo il lavoro del Brian del 1930 sulle Grotte del Genovesato” e poi “nel 1940 lo studio accurato delle Grotte di Toirano, lavoro ancora oggi considerato fondamentale...”

L'arrivo della guerra troncò di fatto “il lavoro così ben iniziato dal Gruppo Speleologico Ligure impedendone le ricerche e soprattutto sciogliendo di fatto, anche se non ufficialmente” l'Associazione. “Gran parte del materiale che era stato accantonato presso il Museo Civico di Storia Naturale di Genova veniva ad essere disperso o distrutto per via dell'incendio che subì il Museo nel novembre 1942”.

La ricostituzione del Gruppo avvenne nel 1948, e lo studio delle grotte liguri fu ripreso “con metodo rigorosamente scientifico e con criteri moderni. Alla prima esplorazione di assaggio, infatti, ne seguivano molte altre, quante cioè ne occorreavano per portare l'esame della grotta il più profondo possibile ed avere un quadro completo sotto i vari aspetti faunistici, mineralogici, geologici, paleontologici, archeologici...”

Si arrivò così, nel 1953, ad avere i dati completi di 156 grotte, e vennero inoltre effettuati studi sistematici “per alcune zone caratteristiche della Liguria” quali “il Finalese, la zona di Toirano, la Provincia di Genova, e una parte della zona della Provincia di La Spezia”.

Sono inoltre di quel periodo i lavori “di Sanfilippo sulle grotte della Provincia di Genova, studio sistematico ed accurato dove sono

nominate 48 cavità di cui 21 nuove", e quello, importante, di Franciscolo sulle grotte del Finalese.

Fra le altre iniziative di quel periodo, meritano di essere ricordati il lavoro di Conci (futuro Direttore del Museo di Storia Naturale di Milano) sulle Arene Candide, corredato di "un bellissimo rilievo", e lo studio topografico, che Soprintendenza e Istituto Nazionale di Paleontologia umana affidarono alla nostra associazione, della nuova cavità di Toirano, scoperta per l'entusiasmo di alcuni appassionati locali. L'impresa "occupò un mese di lavoro durante il quale si esaminarono, si può dire passo per passo, 15.000 mq di terreno all'esterno, comprendenti appunto tutta la zona fra la Basua, la Grotta di S. Lucia, la Tanassa, S. Lucia inferiore e le altre piccole cavità che si trovano nello stesso comprensorio. All'esame dei dati ottenuti si ebbe una sorprendente scoperta e cioè che tutte queste grotte che si credevano indipendenti appartenevano in effetti ad un unico sistema".

Sul finire del 1954 la quantità di lavoro portata a termine dal Gruppo, tenuto anche conto dei mezzi dell'epoca, poteva ben a ragione definirsi "enorme".

Si arrivò a un elenco catastale di 258 cavità, che fu pubblicato appunto da Coddé su *Rassegna Speleologica Italiana* nel 1955.

Ma non era finita:

"Sempre nello stesso periodo il Gruppo Speleologico Ligure volle cimentarsi anche in un'altra impresa: in quella cioè di far conoscere al pubblico le meraviglie del mondo sotterraneo. Con mezzi di fortuna e superando con grande entusiasmo difficoltà tecniche ed organizzative si poté fare un film a carattere documentario all'interno di una grotta: fu scelta la grotta Staricco a Borgio Verezzi a 4 Km da Finale... Le nostre fatiche ebbero anche un riconoscimento ufficiale perché questo film venne presentato al Festival Internazionale del Film a Passo Ridotto di Rapallo del 1955 ed ebbe il I° Premio per la parte documentaria.

La campagna di ricerche speleologiche non venne però a cessare ma, in collaborazione con i Gruppi di Trieste e di Torino, si allargò estendendosi, con la spedizione al Marguareis del 1955, anche alle Alpi Marittime..."

Del Gruppo erano intanto entrati a far parte tra gli altri il prof. Gian Maria Ghidini, zoologo e pubblicista di grande valore, per me in anni più tardi caro maestro di vita e di dignità civile prima ancora

che di speleologia, il quale nel 1956 avviò una iniziativa di carattere nazionale, il “Centro di Inanellamento Pipistrelli”³, l’archeologo Giuseppe Isetti, e Milly Leale Anfossi, cui si devono fondamentali ricerche preistoriche nell’entroterra di Albenga, in Val Pennavaira, tutte gestite con la stretta collaborazione del Gruppo.

Fu costituita una sezione “Ingauna”; le grotte a catasto raggiunsero nel 1959 il numero di 348; vennero esplorate grotte di notevole profondità (per il carsismo ligure) quali l’Abisso di Monte Nero N. 306 Li e via di questo passo.

Nel 1959 il dr. Ing. Paolo Bensa, per tanti anni presidente del Gruppo, lasciò la carica per motivi di età e di salute. Fu nominato presidente onorario a vita e gli subentrò il Dott. Felice Capra, entomologo di fama internazionale. Nel Gruppo erano arrivati molti giovani, e l’attività procedette a pieno ritmo per diversi anni (basti per tutti il nome di Ribaldone); seguì quindi un lungo momento di stasi, dovuto al fatto che molti dei giovani che avevano costituito il nucleo operativo dell’associazione, dopo la laurea, furono costretti a pensare ad altre cose. Purtroppo in Liguria non si è mai riusciti a sbarcare il lunario facendo speleologia.

E qui mi fermo, perché si sta pericolosamente avvicinando il 1963, anno nel quale all’Issel arrivai io, seguito da molti altri. E questa non è più, come ho già detto, cronaca ovvero storia su cui desideri intrattenervi.

Ciò di cui vorrei invece parlarvi brevemente, e poi concludo lasciando spazio alle comunicazioni, è rappresentato dai “perché” di una continuità e coerenza così a lungo protratta nel tempo, e che spesso non è stata indolore.

Avete capito, già da queste rapidissime note, quali sono le nostre radici. Di che pasta siamo fatti.

Mi sono però chiesto in passato: “siamo fatti” o “sono fatto”? (e scusate se per forza di cose devo far riferimento alla mia personale presenza nell’associazione, protrattasi per quasi quarant’anni).

³ In seguito abbandonata anche perché non priva di conseguenze microtraumatiche croniche negative per i pipistrelli inanellati.

Se una cosa mi corre infatti l'obbligo di ammettere, parlando di fronte a voi come in confessione, è che il Gruppo Issel, dopo che io ne sono diventato presidente (ma per molti versi anche prima) è stato, sia pure con vari intervalli, ciò che io ho voluto che fosse (nel bene o nel male lascerò ad altri giudicare).

Non è molto bello quando una Associazione si riduce ad essere espressione delle volontà di un singolo: questo vuol dire in buona sostanza che è venuta a mancare la forte vitalità interna che deve per forza di cose essere legata ad un contraddittorio, ad una pluralità di opinioni.

Si è verificato invece che, a parte uno sparuto manipolo con il quale condivido valutazioni ed interessi, altri che si sono avvicinati all' "Issel" in questi anni se ne siano via via allontanati o siano stati messi -da me soprattutto- in condizione di doversene andare.

E questo, sia chiaro, non a seguito di antipatie o dissidi personali, ma sempre e soltanto perché io e i pochi che hanno voluto seguirmi abbiamo costantemente ritenuto che lo "stile" e le finalità ispiratrici profonde, le ragioni storiche e culturali che riteniamo essere state alla base dell' "Issel" fossero un "unicum" anticipatore di futuro e non conservatore di mentalità e posizioni obsolete; in conseguenza ho ed abbiamo operato in modo che quello stile e quelle finalità non venissero mai tradite, con ciò rinunciando a dar vita ad un'associazione, vitale per numero di iscritti, ma snaturata rispetto ai criteri ispiratori dell'"Issel" 1932 (e magari 1888...).

"Sport-esplorazione-scienza". Ovvero: "esplorazione-sport-scienza". Ovvero: "scienza-sport-esplorazione". Nient'altro, ma è tutto. Niente organizzazioni rigidamente gerarchiche o paramilitari, niente signorsì e signorno, niente megaraduni con la sbronza obbligata, niente "voprofondo e non mi guardo intorno", niente "devofarcideisoldi", niente (e questo è più difficile da capire) corso di primo, di secondo, di decimo livello. Niente istruttore di primo, di secondo, di ventiduesimo grado. Invece: vieni in grotta con noi e pian piano impari. E se sei giovane e forte, quando sei diventato bravo sei tu che ti organizzi la squadra di punta o di fondo abisso. Ma senza spocchia, senza mettersi la divisa da generale, senza guardare con sufficienza quello che raccoglie i *Duvalius* nella grottina da cinquanta metri: "Sport-esplorazione-scienza". Ovvero eccetera...

Ecco, è di questi postulati irrinunciabili che, nei lunghi anni della mia presidenza, io ho cercato di farmi portavoce e bandiera. E vi garantisco che tutta la storia successiva, almeno a partire dal

momento in cui mi sono state affidate le redini del Gruppo, è stato un tentativo ininterrotto di non tagliare quelle radici, di non lasciar venir meno quegli ideali. E penso di esserci riuscito ma, ahinoi, a un prezzo altissimo; visto che la rete, tirata a riva, di pescato ne ha prodotto davvero poco...

In più, di mio, ci ho messo un bisogno imperioso: quello di veder affermato sempre, anche solo parlando di grotte che come noto non sono la componente essenziale ed irrinunciabile della società civile, il diritto e il dovere della giustizia, ed è per questo che ho trascinato il Gruppo in battaglie giudiziarie e di principio forse sproporzionate, ma delle quali non sono a tutt'oggi pentito. Attenzione però che anche in questo sono stato discepolo e non maestro, perché io ricordo bene certe vicende degli anni nei quali, studente liceale, ero appena entrato a far parte del Gruppo, che ebbero il prof. Ghidini come dignitoso ed indimenticabile protagonista, con comportamenti che non ho mai più dimenticato e che mi sono stati di sprone e di viatico nel tentativo di gestire con dignità le personali vicende della mia vita e non solo quelle dell'associazione con la quale per forza di abitudine sono quasi portato ad identificarmi.

La sola differenza è che Ghidini, disgustato, anche per sopravvenuti gravi motivi di salute, con molta signorile dignità, preferì andarsene, mentre io, puntiglioso fino all'antipatia, a dire signornò nel Gruppo ci sono rimasto e ci rimango anche ora che sono quasi vecchio. E a un quasi vecchio (ma non esageriamo) un piccolo vezzo concedetelo. Avrete capito come appunto Ghidini sia stato, fra i soci dell' "Issel" quello nel quale maggiormente identifico la "summa" degli ideali di cui vi ho appena parlato. Per questo, idealmente, a convocare questo Convegno c'era anche Lui.

Lasciatemele dunque di nuovo pronunciare le parole ormai obsolete con cui lo ricordai, nel corso del XII Congresso Nazionale di Speleologia a S. Pellegrino Terme, il 1° novembre 1974⁴:

"Signori Congressisti,

Vi prego di scusarmi ... se sento il bisogno di dedicare qualche attimo al ricordo di un caro Maestro e Amico recentemente scomparso.

⁴ Intervento nella I^a seduta scientifica (1.XI.1974) - Atti XII Congr. naz. Speleol., S. Pellegrino Terme, 1-4.XI.1974, *Mem. XII Rass. spel. it.*, Como, 1978: 27-28.

Sia chiaro -per carità- che la mia non è una «commemorazione»: di queste ne leggeremo a sufficienza, e ben meritatamente, nei bollettini e negli atti delle varie associazioni scientifiche di cui Egli è stato socio attivissimo per tanti anni.

Eppure è proprio per questo, e nonostante questo, che non mi sembrano inutili le brevi parole dell'affetto e della memoria. So bene come vanno a finire queste cose: di Lui saranno ricordate l'appassionata dedizione e capacità dello studioso, le indiscusse qualità di scienziato e di animatore nei vari campi dell'entomologia, della protezione della natura, della ricerca biospeleologica e della divulgazione scientifica.

Ma ci sono cose che quasi sicuramente non verranno riferite nelle comunicazioni ufficiali, e che pure sono indispensabili a mio giudizio per capire e ricordare in spirito di verità, e senza storture retoriche, la nobile autentica figura dello Scomparso.

Gian Maria Ghidini era un uomo scomodo.

Quando opportunismo e convenienza e doppiogioco si davano la mano e si sedevano al tavolo del compromesso per dire che tutto, sì, andava bene, e che davvero non si vedeva ragione di preoccuparsi a modificare decisioni con tanta autorevolezza magnanima elargite, ecco saltar su Lui, puntiglioso e lucidissimo, indisponente e sicuro, a dire che no le cose non stavano proprio così, che gli dispiaceva tanto ma sul serio non se la sentiva di avallare le affermazioni o le comode certezze dei soliti finti amici o vari «titolati» di turno.

Ecco, la vita pubblica di Ghidini è stata punteggiata da siffatte battaglie, e irrigidimenti, e inevitabili polemiche. E per questo forse, Lui che avrebbe meritato una prestigiosa cattedra universitaria, se ne è andato semplicemente come un ex preside di scuole magistrali.

Ma ciò per fortuna non vuol dire nulla per me e per gli amici che Gli hanno voluto bene. Dirò di più. Anche se sono orgoglioso di chiamare «mio Maestro» il caro Ghidini, so bene di non averne potuto seguire che per un troppo breve periodo gli insegnamenti scientifici, visto che da oltre cinque anni, e cioè a partire dal primo gravissimo attacco cardiaco, Egli si era in pratica ritirato.

Ma pur se i cari giorni del Pro Natura e delle ricerche in grotta o all'isola Gallinara avevano fatto presto a diventare nient'altro che un ricordo, vorrei illudermi che per altri insegnamenti siano bastati i non frequenti incontri di questi anni, la nostra «litigiosa» corrispondenza epistolare, od anche solo la sensazione che a «giudicare»

azioni e proponimenti c'era sempre, nella casa di Via Montevideo a Genova, quella nascosta ma sicura e un po' temuta presenza.

Io mi auguro e Vi auguro di avere la forza di non sacrificare mai il senso delle cose giuste, o anche solo ritenute tali in piena coscienza, al vario gioco degli interessi, della carriera, degli opportunismi. Se alla fine ci saremo riusciti (e non è purtroppo così semplice come l'emozione di momenti può far credere) io sento di poterVi dire con sincerità assoluta che sarà -fra i primi- all'insegnamento di uomini come Ghidini che lo avremo dovuto..."

E questo è quanto. E ciò detto (doverosamente detto), l'attenzione si sposti ora dal passato al presente. Abbiamo tante cose da dirci.

Grazie ancora a tutti voi, e buon lavoro!

ROBERTO POGGI*

LA FIGURA DI ARTURO ISSEL (1842-1922)

Nell'ambito delle celebrazioni per i settant'anni di vita del Gruppo Speleologico Ligure "Arturo Issel" è parso non inopportuno fornire, soprattutto a beneficio dei soci più giovani, qualche nota biografica sullo scienziato cui il Gruppo è dedicato, anche se riesce obiettivamente difficile sintetizzare una vita così lunga ed operosa come quella del Prof. Issel.

Arturo Issel nacque a Genova l'11 aprile 1842, da una famiglia israelitica ("Issel" è la trasformazione di "Israel") con ascendenze in Francia meridionale. Compì gli studi primari e secondari in città, frequentando il Collegio diretto da Ippolito D'Aste, ove ebbe a maestri Francesco Marmocchi per la geografia fisica, Luigi Mercantini per le belle lettere, Ippolito d'Aste per la calligrafia e la drammaturgia, Patrizio Gennari per la botanica, Giovanni Pennacchi per la letteratura e i fratelli Lassovich per la matematica.

Ad alcune di quelle lezioni partecipò come uditor anche un "*patrizio ancora giovanetto*", con cui Issel avrebbe stretto e mantenuto rapporti di stima ed amicizia: si trattava del Marchese Giacomo Doria, che sarebbe stato il futuro fondatore del Museo Civico di Storia Naturale di Genova ma che allora, secondo la testimonianza di Issel, subiva le attenzioni non sempre benevole di "*certi scolaretti screanzati*" che, "*per far pompa di malintesa democrazia, configgevano pennine di ferro colla punta rivolta in su nella seggiola che gli era riservata...*".

Nel 1857-58 Issel frequentò a Parigi i corsi del Liceo Napoleone e poi, seguendo forse un po' la scia del padre che si occupava di ricerche minerarie soprattutto in Sardegna e che aveva radunato

* Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria", Via Brigata Liguria 9, 16121 Genova, Italia; e-mail: museodoria@comune.genova.it

una bella collezione di minerali, si iscrisse alla Facoltà di Scienze Naturali dell'Università di Pisa, ove ebbe come docenti, tra gli altri, Meneghini per la geologia, la mineralogia e la geografia fisica, Paolo Savi per la zoologia, Pietro Savi per l'anatomia comparata e poi Matteucci, Studiati, Felici, Pacinotti, Mossotti, ecc.

Poco dopo la laurea rientrò a Genova, ove iniziò nel 1865 la carriera universitaria come assistente alla cattedra di scienze naturali col malacologo Prof. Salvatore Trinchese; l'anno seguente fu incaricato dell'insegnamento della Mineralogia e della Geologia; nel 1869 fu nominato straordinario e nel 1876 ordinario. Nel 1889, allorché vennero separate le cattedre di Mineralogia e Geologia, optò per quest'ultima. Dal 1893 al 1913 ebbe anche l'incarico di Geografia per gli studenti della facoltà di Lettere.



Fig. 1 - Arturo Issel in età giovanile.

Insegnò fino al 1917, quando compì i 75 anni; morì a Genova 5 anni dopo, ottantenne, il 27 novembre 1922.

Issel svolse le sue ricerche scientifiche soprattutto in Italia, e in particolare in Liguria, ma negli anni giovanili effettuò anche alcune spedizioni oltre i confini nazionali.

Ad esempio nel 1865 fu a Malta e sul Canale di Suez allora in costruzione (e da Alessandria d'Egitto portò con sé in patria il macaco cui diede il nome "Libia") mentre nel 1870 visitò le coste del Mar Rosso con Orazio Antinori, Odoardo Beccari e Giuseppe Sapeto, in occasione dell'acquisto italiano della Baia di Assab.

Nel 1877 partecipò a una delle campagne di esplorazione del cutter "Violante" del Capitano Enrico D'Albertis e in particolare esplorò le isole presso le coste tunisine; nel 1895 fu infine a Zante e in Grecia.

Al Mar Rosso Issel dedicò un'importante monografia ("Malacologia del Mar Rosso") tuttora citata e consultata e un libro di viaggi ("Viaggio al Mar Rosso") di cui si conoscono cinque edizioni.

Issel fu malacologo, geologo, paleontologo, mineralista, paletnologo, etnografo, antropologo, geografo, glottologo. Sono poche le discipline che egli non coltivò e in ognuno di questi campi pubblicò moltissimi contributi. Si dice che i suoi lavori assommino a 312, ma in tale computo non rientrano i numerosi articoli apparsi su diversi quotidiani, spesso in forma anonima, anche su argomenti storici, politici e d'attualità.

Issel è tuttora famoso per essere stato l'autore di alcuni ponderosi saggi, quali "Liguria geologica e preistorica", pubblicata in occasione delle Celebrazioni colombiane del 1892, "Liguria preistorica", stampata nel 1908 dalla Società Ligure di Storia Patria, e il "Compendio di Geologia" del 1896, ma va ricordato anche come il coautore (con Zaccagna e Mazzuoli) della grande carta geologica della Liguria, come l'inventore del termine "bradisismo" per indicare le oscillazioni lente del suolo, o come il fondatore del piano "Tirreniano" del Pleistocene (per i sedimenti di origine marina in un periodo interglaciale).

Proseguendo le pionieristiche ricerche del Marchese Lorenzo Pareto, egli svolse indagini sulle valli sommerse del Golfo ligure, stabilì l'età miocenica della Pietra del Finale e quella triassica del complesso dolomitico del Monte Gazzo, confermò la linea di confine

tra formazioni alpine ed appenniniche lungo il Torrente Chiaravagna e studiò i terremoti liguri del 1887, occupandosi poi anche delle incisioni rupestri delle Alpi Marittime.

Scrisse con Raffaello Gestro le “Istruzioni Scientifiche per i viaggiatori” e con Enrico Hillyer Giglioli un volumetto (“Pelagos”) sulla vita nel mare; da solo stese note sulla storia dei naturalisti liguri e sulla pesca del corallo, delle spugne e delle ostriche e compilò una fondamentale “Bibliografia scientifica della Liguria” relativa, come recita il sottotitolo, a “Geologia, Paleontologia, Mineralogia e scienze affini”.

Approfittando degli sbancamenti nella zona di Via Venti Settembre, Piazza De Ferrari e Via Roma studiò la fauna pliocenica del centro di Genova, rinvenendo tra l'altro anche resti di un dugongo fossile del genere *Felsinotherium* (oggi *Metaxytherium subapenninum*). Si occupò inoltre di applicazioni pratiche della geologia per aperture di strade, gallerie e linee ferroviarie e per la ricerca di acque sotterranee potabili.

In ambito universitario dal 1888 riorganizzò ed ampliò il Museo Geologico, che riuscì a portare a Villetta Di Negro, allorché nel 1912 essa venne lasciata libera dal Museo Civico di Storia Naturale, che si era trasferito nell'attuale sede di Via Brigata Liguria.

Tra le decine di cariche ricoperte da Issel si può ricordare che fu:

- Presidente del R. Comitato Geologico d'Italia;
- Tecnico esperto del R. Comitato Talassografico;
- Membro della Società Imperiale dei Naturalisti di Mosca;
- Socio corrispondente della Reale Accademia delle Scienze di Torino, della Società Geologica di Londra e della Società Antropologica di Parigi;
- Socio onorario della Società Geologica del Belgio, del Reale Istituto di Incoraggiamento in Napoli, della Reale Società Geografica Italiana, della Società di Letture e Conversazioni Scientifiche di Genova e della Società Ligure di Storia Patria;
- Socio nazionale della R. Accademia dei Lincei, della Società “Dante Alighieri” e della Società Ligustica di Scienze Naturali e Geografiche;
- Socio fondatore della Sezione Ligure del Club Alpino Italiano;
- Consigliere Comunale a Genova.

Ricevette due medaglie d'argento dalla Società Geografica Italiana ed una d'oro dall'Istituto di Francia e fu inoltre nominato da Vittorio Emanuele II Commendatore e Grande Ufficiale dei santi Maurizio e Lazzaro.

E infine il 9 dicembre 1907 ricevette solenni onoranze per il 40° di insegnamento all'Università; in tale occasione nacque la "Fondazione Arturo Issel" per premiare studenti meritevoli in scienze naturali e geografia.



Fig. 2 - Gruppo dei partecipanti alla gita all'Isola e alla Grotta di Bergeggi (SV), organizzata dalla Società Ligustica di Scienze Naturali di Genova il 10.VI.1894. Arturo Issel è seduto in primo piano, a capo chino, ed impugna il martello da geologo.

Ho volutamente lasciata per ultima la citazione relativa al fatto che Issel fu anche speleologo, anzi fu uno degli iniziatori della speleologia ligure, essendo autore di una cinquantina di pubblicazioni

riferibili alla speleologia paleontologica e paleontologica, a cominciare dal primo lavoro del 1864, sulla paleontologia della Grotta delle Arene Candide, nel Finalese, sino a quello su “Le caverne e la loro esplorazione scientifica”, pubblicato dal Club Alpino Italiano di Genova nel 1915, che l’Autore definiva un “libercolo”, ma che in realtà era un importantissimo ed aggiornato testo di consultazione. E’ per tutti questi motivi che il 1° febbraio 1932, al Circolo della Stampa di Genova, si propose di intitolargli il Gruppo Speleologico Ligure che si andava fondando.



Fig. 3 - Enrico Hillyer Giglioli, Giacomo Doria ed Arturo Issel a Genova, nella prima decade del 1900.

Arturo Issel è ricordato a Finale Ligure dal Liceo a lui intitolato, a Malta, nel Museo della Valletta, per i reperti paleontologici (in particolare gli elefanti nani), a Genova da una strada a Sam-

pierdarena (da Via Balbi Piovera a Salita Beccaria), nell'Istituto Mazziniano per una parte dei suoi scritti e del suo epistolario, nelle collezioni universitarie di Mineralogia e Paleontologia per una serie di reperti e nel Museo "Doria" per la presenza di una buona parte della sua collezione malacologica e della sua biblioteca.

Assai legato a questo Museo, Issel tra l'altro fu uno dei relatori ufficiali nella cerimonia di inaugurazione del nuovo edificio, il 17 ottobre 1912, mentre l'anno successivo, il 25 novembre 1913, lesse una documentata biografia di Giacomo Doria, in occasione della commemorazione ufficiale dell'estinto tenutasi al Consiglio Comunale di Genova.

Ma per concludere questo breve ricordo vorrei fornire qualche dato anche sulla vita privata di Issel. Dal matrimonio con Bettina Ascoli, figlia del celebre glottologo goriziano Graziadio Isaia Ascoli, nacquero i figli Lia e Raffaele. Raffaele, nato nel 1878, fu un biologo marino che lavorò a Rovigno d'Istria e che nel 1922, pochi giorni dopo la morte del padre, fu nominato Professore di Zoologia presso l'Università di Genova, ove prese servizio dal 1923; deceduto prematuramente nel 1936, lasciò la moglie Olimpia e le figlie Bettina e Silvana; da quest'ultima e dal marito Silvio Barni è poi nata Raffaella e da lei deriva l'ulteriore discendenza.

Bettina e Raffaella, rispettivamente nipote e pronipote dirette di Arturo Issel, ci hanno fatto l'onore di presenziare alla cerimonia di apertura del convegno sugli *Speleomantes*; la loro partecipazione costituisce per tutti noi un motivo di grande soddisfazione ed io le ringrazio di cuore a nome del Comitato organizzatore per aver aderito al nostro invito.

ROBERTO POGGI*

NOTE D'ARCHIVIO SULLA FONDAZIONE DEL GRUPPO "ISSEL"

La relazione sulla fondazione del Gruppo Speleologico Ligure "Arturo Issel" apparve il 3 febbraio 1932 sul quotidiano "Giornale di Genova", in quarta pagina, con una nota redazionale su doppia colonna.

Il "Giornale di Genova", ideale prosecuzione del "Caffaro", si definiva "Quotidiano del Fascismo ligure" e fu stampato a Genova dal 1923 al 1943; la sede era posta in Via Brigata Liguria 15, a due isolati di distanza dal Museo Civico di Storia Naturale.

Nel secondo semestre del 1931, e in particolare dopo una esplorazione della Grotta delle Arene Candide (presso Finale Ligure), svoltasi in giugno, il giornale aveva patrocinato la costituzione di un gruppo speleologico, ricevendo di mese in mese varie adesioni al progetto, che si concretizzò poi la sera di lunedì 1° febbraio 1932 con la presentazione formale nel Circolo della Stampa di Genova, in Piazza San Matteo, annunciata nell'edizione di sabato 30 gennaio.

Data la non facile reperibilità dell'articolo sopra citato, si ritiene non privo di qualche interesse per gli speleologi trascriverne qui di seguito il testo e riprodurre la foto che lo correda.

Dal "Giornale di Genova", Anno 10°, n. 29, pag. 4, di mercoledì 3 febbraio 1932:

* Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria", Via Brigata Liguria 9, 16121 Genova, Italia; e-mail: museodoria@comune.genova.it

Questo contributo non è stato presentato al convegno sugli *Speleomantes*, ma elaborato successivamente.

Gli esploratori di caverne.

Il Gruppo speleologico ligure costituito al Circolo della Stampa.

Il sogno degli appassionati di speleologia, dei solitari e quindi poco noti poeti di tutti i misteri e di tutte le vergini bellezze della natura si è dunque realizzato. Anche Genova, anche la Liguria ha finalmente, come tutte le regioni d'Italia, il suo "Gruppo Speleologico" costituitosi lunedì sera al Circolo della Stampa e posto sotto il patrocinio del nostro giornale. Non mai, forse, le sale del Circolo videro adunarsi insieme fra le loro pareti tanti illustri maestri del pensiero e tanti giovani gagliardi e volenterosi, entusiasti dell'avventura, della ricerca e dell'ignoto: non mai forse, gruppo speleologico è nato con più robustezza, con più compatta comprensione di idealità fra scienza pensante e volontà operante, con entusiasmo più alto e più nobile e più sentito del "Gruppo Speleologico Ligure".

Ma per dare una precisa idea del come nasce questo Gruppo occorre qui trascrivere qualche nome. Notiamo fra i presenti: il prof. Raffaele Issel e il prof. Alessandro Brian, entrambi della nostra R. Università, il prof. Decio Vinciguerra, vice direttore del Civico Museo di Storia Naturale anche in rappresentanza del direttore, prof. Gestro, il prof. Renato Santucci della nostra R. Università, il prof. Vito Zerilli del R. Liceo Colombo, il prof. Capra, del Civico Museo di Storia Naturale, il prof. Paolo Paola, il prof. ing. Tito Canessa, membro della Commissione Conservatrice Monumenti per Genova e Liguria, l'avv. cav. uff. Umberto Ferraris, il comm. dott. G. M. Mignone in rappresentanza anche del prof. comm. Orlando Grosso, direttore dell' Ufficio delle Belle Arti, il dott. ing. Mario Martinengo del nostro Municipio, l'ing. Paolo Bensa, il prof. Baccino, l'entomologo dott. Cesare Mancini, i signori Albino Torra, Mario Pingue, Stefano Cantelli, Francesco Imperiale, Giulio Miscosi, Carlo Rodolo, De Benedetti, Giovanni Moro, Amedeo Pinceti, Giuseppe De Grada, Arnaldo Trabucco, Maurizio Carcerò, Pucillo Umberto, Mario Linari e i nostri coraggiosi e... indispensabili amici delle Arene Candide: il graduato dei pompieri Gaspare Bertolli e i militi Giovanni Ricci, Edilio Torazza e Edelfo Malcapi che di tutto cuore hanno aderito impazienti di future esplorazioni.

Mandarono, con la loro adesione il loro saluto entusiastico e il loro rincrescimento per l'impossibilità di intervenire alla riunione il nostro direttore, il prof. Luigi Colomba, già direttore dell'Istituto Mineralogico

della R. Università, il prof. Orlando Grosso, il dott. Carlo Gentile, direttore del R. Osservatorio di Imperia, l'ing. dott. Gabriele Lincio¹, già professore di Mineralogia e petrografia applicata della nostra R. Università, il conte avv. cav. Filippo Gramatica, l'avv.to Eddo Bruno Cavazzini, il sig. F. A. Aurnheimer, il collega dott. Federico Striglia, del "Lavoro"; il Sovrintendente Incaricato ai Musei e Scavi per il Piemonte e Liguria, prof. Barocelli, il dott. F. G. Cabalzar, i sigg. Emanuele Garibaldi, Alberto Pasquali, Rossi Giustino, Giorgio Ollinger, Aldo Festa, Gino Padoa e Guido Francone.

Eletto alla presidenza il prof. Raffaele Issel, viene dichiarata aperta l'assemblea e dopo che tutti gli intervenuti hanno preso il loro posto, il prof. Issel prende la parola per ringraziare con nobilissime parole tutti coloro che alla magnifica iniziativa hanno dato impulso e vita. Il prof. Issel invita quindi uno dei rappresentanti il nostro giornale a fare una rapida relazione dei fatti che hanno portato alla costituzione del Gruppo e l'esposizione viene fatta da Attilio Ranghieri che accenna brevemente alla esplorazione delle Arene Candide, compiuta nel giugno 1931, per passare poi all'interesse che ha animato e anima tutti coloro che all'iniziativa partita dal nostro giornale hanno incondizionatamente aderito.

Poiché il Presidente e i presenti vogliono che parli si alza quindi a parlare l'amico nostro e collaboratore Umberto Ferraris, che pronuncia uno di quei discorsi intessuti di arguzia e di poesia che gli sono caratteristici. "Evidentemente, egli dice, imponendomi di parlare voi avete pensato: C'è qui dentro un avvocato, che ha consuetudine di tediare il prossimo. Parli. Che è venuto a fare tra la seria gente che si occupa di studi faticosi se non parla? Io vi rispondo: accetto perché la mia funzione è simpatica: tenere a battesimo il gruppo speleologico ligure."

Precisate le origini del Gruppo, nato appunto attraverso il nostro giornale, l'avv. Umberto Ferraris commemora la nobile figura di G. B. Leale che fu uno dei primi aderenti e che la morte ha rapito anzi che potesse vedere il sorgere del Gruppo, quindi continua: "Il Gruppo Speleologico Ligure nasce da un ansito di poesia che si accompagna alla severità di uno studio. Il suo domani non ne potrà mutare il volto". L'oratore conclude il suo dire proponendo, fra grandi applausi, che il Gruppo Speleologico Ligure sia intitolato ad Arturo Issel. Se la spe-

¹ Per errore di stampa indicato nel testo originale come "Levicio".

leologia ligure, egli dice, ha infatti un nome che la illustri questo nome è Arturo Issel, scienziato di altissimo ingegno che come pochi fu tenace, assiduo, laborioso.

Applausi vivissimi, salutano il dire dell'avv. Ferraris al quale il Presidente rivolge commosso il suo particolare ringraziamento per l'omaggio che viene fatto alla memoria illustre del padre suo. Dopo di che, discusse altre varie circostanze viene deliberata l'elezione di un consiglio provvisorio per la compilazione dello statuto e per lo svolgimento delle prime pratiche inerenti la costituzione del Gruppo. Il Consiglio che si radunerà mercoledì prossimo al Civico Museo di Storia Naturale per la stesura dello statuto, è composto dai sigg.: prof. Brian, Presidente — Proff.: Issel, Vinciguerra, comm. Migone, due redattori del nostro giornale, consiglieri e Albino Torra, segretario.

GLI ESPLORATORI DI CAVERNE

Il Gruppo speleologico ligure

costituito al Circolo della Stampa



Il primo nucleo di aderenti al Gruppo Speleologico « Issel »
(Foto Bianchi - L'Espresso Treggi)

La foto pubblicata a corredo dell'articolo, e qui riprodotta, porta la didascalia: "Il primo nucleo di aderenti al Gruppo Speleologico «Issel» (Foto Binelli - Lastre Tenzi)".

L'immagine non è certo in condizioni di buona leggibilità, ma ciò è dovuto, più che agli oltre settant'anni trascorsi dal momento dello scatto, soprattutto alla bassa qualità della carta utilizzata originariamente per la stampa del giornale e al notevole impatto del retino fotografico.

Ciononostante si possono individuare almeno alcuni dei personaggi citati nell'articolo, ed in particolare quelli indicati qui di seguito e più conosciuti di altri nell'ambito scientifico genovese.

Nella prima fila (seduti):

- 4° da sinistra = Prof. Alessandro Brian (Istituto di Zoologia dell'Università),
- 5° da sinistra = Prof. Raffaele Issel (Direttore dell'Istituto di Zoologia dell'Università e figlio del Prof. Arturo),
- 6° da sinistra = Prof. Decio Vinciguerra (Vice-Direttore del Museo Civico di Storia Naturale).

Nella seconda fila (in piedi):

- 1° da destra = Rag. Cesare Mancini (entomologo e speleologo),
- 2° da destra = Prof. Renato Santucci (Aiuto presso l'Istituto di Zoologia dell'Università),
- 3° da destra = Dr. Felice Capra (Conservatore del Museo Civico di Storia Naturale),
- 6° da destra = Ing. Paolo Bensa (speleologo ed entomologo).

MASSIMO DELFINO *, EDOARDO RAZZETTI ** & SEBASTIANO SALVIDIO ***

EUROPEAN PLETHODONTIDS: PALAEONTOLOGICAL
DATA AND BIOGEOGRAPHICAL CONSIDERATIONS
(AMPHIBIA)

INTRODUCTION

The family Plethodontidae offers one of the most fascinating and curious cases of biogeography. Although it is the caudate family with the highest number of representatives (more than half of the caudate species), plethodontids show a range that is almost entirely American, the only exception being the presence of some species in a limited area of Europe: south-eastern France, part of the Italian peninsula and Sardinia (LANZA *et alii* 1995; GASC *et alii* 1997; POUGH *et alii* 2001). The fact that European populations appear to be similar to some Californian species, and hence considered by some authors (among others JACKMAN *et alii* 1997; POUGH *et alii* 2001) as belonging to the same genus (*Hydromantes* Gistel, 1848), makes the case even more curious deserving the definition written more than 20 years ago by LANZA & VANNI (1981): “the *Hydromantes* problem”.

Even not taking into consideration the nomenclatural status of the European species, whether allocated to *Hydromantes* or to the genus *Speleomantes* Dubois, 1984 (see DUBOIS 1984, for details; LANZA *et alii* 1995; SOCIETAS HERPETOLOGICA ITALICA 1996; RAZZETTI *et alii* 2001), the solution of the biogeographic problem requires answers

* Dipartimento di Scienze della Terra, Università di Firenze, Via La Pira 4, 50121 Firenze, Italia; e-mail: massimo.delfino@unifi.it

** Centro Interdipartimentale di Servizi “Musei Universitari”, Università di Pavia, Piazza Botta 9, 27100 Pavia, Italia; e-mail: razzetti@unipv.it

*** Dipartimento per lo studio del Territorio e delle sue Risorse, Università di Genova, Corso Europa 26, 16132 Genova, Italia & Gruppo Speleologico Ligure “A. Issel”, Busalla (GE), Italia; e-mail: salvidio@dipteris.unige.it

concerning the phylogenetic relationships of the European and Californian species, and, as all the authors agree in recognising a North American centre of dispersal for this family, when and how the spread toward Europe took place. Since an answer to such questions requires the collection of information concerning processes developed through time, it could be of some help to determine if the fossil record can furnish any clue.

RESULTS

As already noted by MILNER (2000), the caudate fossil record is palaeoecologically and taphonomically biased and the terrestrial and upland stream-dwellers of small size (as the plethodontids) are under represented. The fossil record of Cenozoic caudates is relatively poor if compared to that one of anurans and it is based mostly on remains of isolated vertebrae.

At present Europe is inhabited by members of four caudate families, Hynobiidae, Plethodontidae, Proteidae and Salamandridae (GASC *et alii* 1997), whose isolated trunk vertebrae are not difficult to allocate at order and family rank. In particular, plethodontids and salamandrids are the only ones with intravertebral exits of spinal nerves: vertebrae of these groups are therefore characterised by a distinct foramen opening on each side of the neural arch, at its base, caudal to the rib-bearers (EDWARDS 1976). Plethodontids can be distinguished from salamandrids since their vertebral bodies are amphicoelous and not opisthocoelous (ESTES 1981; MILNER 2000). Even not taking into consideration several other secondary characters, the presence of these foramina, as well as the centrum condition, are almost always detectable on fossil material (also on poorly preserved vertebrae) allowing an easy identification of plethodontids. Hence, it is rather surprising that the European fossil record is limited to the following 6 localities:

Locality	Region (Province) & Country	Age	References
Grotta Corbeddu, Oliena	Sardinia (NU), Italy	Late Pleistocene and Holocene	SONDAAR <i>et alii</i> 1984 and 1988; CALOI <i>et alii</i> 1986
Valdemino, Borgio- Verezzi	Liguria (SV), Italy	Middle Pleistocene	DELFINO 2002 and 2004
Grotte du Vallonnet	Alpes-Maritimes, France	Early Pleistocene	BAILON, pers. comm. (18-04-2002)
Monte Tuttavista, Orosei	Sardinia (NU), Italy	Plio-Pleistocene	DELFINO 2002; ABBAZZI <i>et alii</i> 2004
Siniscola	Sardinia (NU), Italy	undet. Pliocene (?)	LANZA <i>et alii</i> 1995
San Giovanni, Domusnovas	Sardinia (CA), Italy	undet. Pliocene (?)	LANZA <i>et alii</i> 1995

The most striking characteristic of these few data is that all the localities are relatively young in age (at least post Miocene; the remains of Siniscola and Domusnovas could be not Pliocene but Pleistocene in age) and limited in distribution within the modern range of the genus: 4 of them are on an island (Sardinia) and only 2 are from the mainland (Liguria -Italy- and Alpes-Maritimes -France).

Concerning the specific allocation of the remains, only those ones from Grotta Corbeddu have been referred at species rank: CALOI *et alii* (1986) identify them as *Speleomantes supramontis* (*Hydromantes supramontis* in the paper). However, this specific allocation does not seem to be grounded on morphology (a description is lacking) but only on the geographical provenience of the material, as Grotta Corbeddu is located in the *S. supramontis* range. Using a rigorous approach, it is therefore advisable to consider this datum simply at genus rank.

Although some features allowing a discrimination between the presently recognised 7 living European species have been described in the analysis performed by LANZA and co-workers (1995), they are not applicable to fossil remains that are usually represented by isolated vertebrae or, exceptionally, by disarticulated dentaries, maxillae and limb bones as in the case of the Monte Tuttavista sites (DELFINO 2002 and pers. obs.). The fossil remains of the European plethodontids are therefore not identifiable at species rank.

The fact that European fossils are relatively young, come exclusively from the present range and cannot be identified at species rank, makes them unsuitable for the determination of the route of dispersal from America to Europe and apparently useless in resolving the phylogenetic relationships of the modern taxa.

DISCUSSION

Several hypotheses have been put forward concerning the origin of European plethodontids. LANZA *et alii* (1995) thoroughly sum up the opinions of different authors grouping them into 3 categories: introduction by man, spread through a North Atlantic past connection and spread through the North Pacific Beringian Bridge (and then across the whole Asia). According to different authors, the timing of such spreads range from Cretaceous to Pliocene or even to Holocene if we consider the possibility of an introduction by man.

If the hypothesis of an anthropochorous origin can be easily excluded because European fossils predate the origin of mankind, it is rather difficult to evaluate the validity of the two other options.

The background information that should be taken into consideration to correctly confront this aspect of the “*Hydromantes* problem” can be summarised as follows:

- plethodontids probably originated in North America and should be at least 80 million years (Myr) old; their antiquity can be inferred by the sister-group relationships with the family Amphiumidae whose fossil record extends into the Upper Cretaceous (MILNER 2000);
- the fossil record of plethodontids is astonishingly poor and recent: not taking into account a single vertebra coming from the Lower Cretaceous of Spain, that showing intravertebral spinal foramina could belong either to the Plethodontidae or the Ambystomatoidea clades; the oldest fossils come from the Lower Miocene of North America (Desmognathinae are known from the Pleistocene, Plethodontini from the Lower Miocene, Hemidactyliini from the Pleistocene and Bolitoglossini from the Upper Miocene of North America; MILNER 2000 and cited references);
- North America land continuity with Europe ended approximately

around 49 Myr ago, during the Lower Eocene (McKENNA 1975 and cited references);

- North American permanent land continuity with Asia (through the Beringian Bridge) ended during the Neogene, probably already during the Miocene (SHER 1999; MARINCOVICH & GLADENKOV 1999);
- Europe had been isolated between the Lower Eocene and the beginning of the Oligocene not only from North America but also from Asia because of the presence of the Obik Sea and the Turgai Strait which extended from the Arctic Ocean to the Tethyan sea (McKENNA 1975 and quoted references; for the effects of the closure of Turgai Strait on western European herpetofauna see RAGE 1984, 1986);
- on allozyme and immunological basis, the separation between the Californian and European plethodontids has been assessed to be 28 Myr old (WAKE *et alii* 1978);
- caudates cannot easily cross salt-water barriers being extremely sensible to osmotic variations.

The supporters of the “Beringian hypothesis” give credit to the assumed 28 Myr old separation between the Californian and European plethodontids. Since the Atlantic Ocean was already open at that time, the only available possibility for plethodontids to reach Europe was to spread through the Beringian Bridge and subsequently across Asia. The timing of the separation between the two lineages is not in conflict with the history of the Beringian Bridge. According to SHER (1999), Asia and North America “before the Neogene had constituted a single continent”, that is to say that prior to 16-17 Myr plethodontids could have colonised Asia via the Bering Bridge. This is supposed to have happened to the anuran families of Bufonidae and Hylidae during the Oligocene (BORKIN 1999 and quoted literature) or earlier. Although intermittent contacts took place during the Neogene and Quaternary, a late Neogene spread of plethodontids can be excluded not only because of possible unfavourable environmental conditions, but also because fossils indicate their presence in Sardinia during the Pliocene already.

On the other hand, LANZA *et alii* (1995) state that “it appears hardly credible that a whole family [...] disappeared from almost all of Europe and from all of Asia, or at least from all of Palearctic Asia, all the more so because wide proportions of the latter (SCHMIDT 1946) surely felt no or only slight effects of the Pleistocene glaciation”. This objection seems to be so strong to deserve some comments. The “Beringian hypothesis” and a westward spread towards Europe could agree with the general trend that sees the post-Oligocene European herpetofauna, the amphibians in particular, as being largely a product of a westward expansion of Asian taxa, but in all the cases in which range shrinkage strongly affected Europe, there are invariably living survivors in south-eastern Europe or Asia (RAGE 1989, 1997; CHEYLAN 1995; SANCHIZ & ROCEK 1996; SANCHIZ 1997; BARBADILLO *et alii* 1997; IVANOV *et alii* 2000; DELFINO 2004). The latter continent seems to be an efficient faunal reservoir for Europe, that preserves living populations belonging not only to American herpetofaunal taxa that moved westward, through the Beringian Bridge, permanently colonising Europe (Bufonidae and Hylidae among anurans), or Asian taxa that temporarily extended their range into Europe (cryptobranchids and hynobiids among caudates), but also taxa that, although having probably originated in Europe, now survive in Asia only (the salamandrid members of the *Chelotriton-Tylototriton* group; CHEYLAN 1995; BORKIN 1999; VENCZEL 1999; MILNER 2000).

Assuming a spread via the Beringian Bridge, even if it is somehow acceptable that plethodontids did not leave fossil remains “while crossing” the entire Asia, it seems to be unlikely that this north American family, which undergo an extensive adaptive radiation in the New World tropics (WAKE 1987), did not leave any relict population in Asia.

Moreover, it is worth mentioning that there are cases, supported by fossil evidences, testifying that among caudates (cryptobranchids and salamandrids; MILNER 2000) faunal exchanges at the Beringian Bridge were directed from Asia to America but not the reverse.

LANZA and co-workers (1995) openly support dispersal of Europe via the “North Atlantic connection”. Due to the ancientness of the last America-Europe direct connection, this hypothesis is incongruent with the supposed timing of split between the Califor-

nian and European species and their synapomorphies (see JACKMAN *et alii* 1997) that seem to require a more recent spread to Europe. However, NARDI *et alii* (2000), on the basis of DNA differences, contradict the idea of close relationships between Californian and European species confirming “that the European and American taxa represent two distantly related groups of species”.

The objection recently moved by MILNER (2000) “As the bolitoglossines are restricted to western North America [...], it seems unlikely that they would have passed across eastern North America, and the developing Atlantic in the Early Cenozoic” is surprising since, the shortest way to reach southern Europe from the western North American coast is to cross the North Atlantic Bridge and not to face the whole of Asia. Moreover, if bolitoglossines originated in eastern North America (in the area now corresponding to the Appalachia) as suggested by WAKE (1966), the quoted objection loses its meaning.

The hypothesis that plethodontids could have reached Europe via the shortest way along with several other vertebrate taxa (McKENNA 1975; WEBB 1985; BRIGGS 1987) during the early-middle Palaeogene seems to be much more reasonable. Among the pre-Oligocene (that is to say before the closure of the Turgai Strait) small-sized herpetofauna there are several examples of taxa that spread from North America to Europe. It could be the case of the caudate family Dicamptodontidae that is now represented by a single genus in western North America but, according to some authors (ESTES 1981; ROCEK 1994), had representatives in Europe during the Palaeocene and Miocene (MILNER 2000, criticised the allocation of the European fossils to this family and considered them as enigmatic forms of uncertain position). Among anurans, a member of the American family Leptodactylidae has been found in the Upper (and possibly Lower) Eocene of Europe (see references in: SANCHIZ 1998; RAGE & ROCEK 2003). Among squamates, lizards of the families Helodermatidae and (perhaps) Necrosauridae reached directly Europe from North America (RAGE & AUGE 1994) while the Eocene snake fauna of Europe is so rich of American representatives that has been defined as “euro-american” (see IVANOV *et alii* 2000 and quoted literature).

The hypothesis of dispersal through the American-European connection requires a prolonged survival in Europe without any

relevant morphological change or with a marked parallel evolution (among plethodontids “parallelism and convergence are rampant”; WAKE 1987). Although surprising, this prolonged survival is not so extraordinary considering that fossils of the living genus *Necturus* (a proteid whose closest relative, *Proteus*, lives in southern Europe) have been identified in the Palaeocene of North America (MILNER 2000), and caudates are known to be morphologically conservative (among others, JOCKUSCH & WAKE 2002).

Concerning the origin of the modern European species, some considerations could be further developed. According to NARDI *et alii* (2000; see also STEFANI 1969, and LANZA *et alii* 1995, for details), molecular systematic, electrophoretic and morphological data support the antiquity of the south-western Sardinian species *Speleomantes genei* (Temminck & Schlegel, 1838). Moreover, this species is the only one in which male digamety doesn't occur, and that is not parasitised by the taxa that eastern Sardinian and mainland species share (see literature in LANZA *et alii* 1995). It could be hypothesised that *S. genei* (or its forerunner) entered Sardinia from the Pyrenees (or south-western France) before the migration of the Corso-Sardinian microplate (migration referred to the Late Oligocene-Early Miocene; ALVAREZ 1972; MONTIGNY *et alii* 1981); the same authors, as well as LANZA *et alii* (1995) and NASCETTI *et alii* (1996) suggest that the eastern Sardinian species could have colonised the island coming from the Italian peninsula during the Late Miocene (Messinian) salinity crisis. The first hypothesis is consistent with what already supported by CACCONE *et alii* (1994) for another caudate genus, genus *Euproctus* Gené, that entered the microplate before its rotation and that still survives in both islands as well as in the Pyrenean region. For parsimony reasons, and taking into consideration the well known conservative power of islands (MASINI *et alii* 2002), the second hypothesis could be modified in the sense that *S. genei*, or its forerunner, entered Sardinia in Oligocene, survived there while mainland (at least Pyrenean) populations went extinct, giving rise to the rest of the Sardinian species (3) which are responsible of the further spread into Peninsular Italy (3 species). This evolutionary scenario has been already suggested by LA GRECA (1984), partly modifying the ideas of STEFANI (1969) who supposed that *S. genei* originated both the eastern Sardinian species and the continental

ones (from an ancient stock that reached the Maritime Alps). The origin of the continental species from the eastern Sardinian ones, rejected by NASCETTI *et alii* (1996) because “not supported by the present patterns of geographic distribution”, is simply speculative at the moment, and the mode and timing of the speciation process still have to be defined (but see FROMHAGE *et alii* 2004, for a similar pattern of dispersal in *Discoglossus*).

It would fit the antiquity of *S. genei*, its lower genetic distance from the other Sardinian species than from the continental ones (LANZA *et alii* 1995: 240; NASCETTI *et alii* 1996: table 3 and 5) and, above all, it would better explain the fact that European fossils are found only inside the present range and mostly in Sardinia (where they are not rare!), a fact suggesting relatively recent expansion of the range on mainland Italy and France. Moreover, molecular data indicate that the separation (from each other) of the modern eastern Sardinian species dates back to the Late Pliocene (CIMMARUTA *et alii* 1998; note that *S. flavus*, the northern species -farthest from *S. genei*- is relatively more differentiated than the others), while the separation (from each other) of the continental species is more recent and seems to be Early Pleistocene in age (FORTI *et alii* 1998).

CONCLUSIONS

The “*Hydromantes* problem” does not seem to show any clear solution. The paucity of fossil remains in both America and Europe does not allow one to directly find a plausible solution to the problem, leading to speculations based on contrasting data which are inferred mainly from biogeography and molecular biology, whose evolutionary weight has not been unambiguously assessed yet.

Under a parsimony approach, assuming a long-term conservation of some traits, it seems more likely that the ancestors on the European taxa spread eastward across the North Atlantic land continuity, rather than westward across the Beringian Bridge and the whole Asia.

In any case, it is possible to predict that outside the modern range of *Speleomantes*, the Pyrenean area is the one which surely can provide fossils of plethodontids.

Furthermore, it is tempting to suggest that the continental species of Europe derive from the eastern Sardinian ones and not the reverse.

ACKNOWLEDGEMENTS

Salvador Bailon (Nice) kindly shared his unpublished datum about the fossil plethodontids from south-eastern France. Roberta Cimmaruta (Viterbo), Benedetto Lanza (Florence), Zbynek Rocek (Prague), Lorenzo Rook (Firenze) and Marton Venczel (Oradea) critically commented earlier drafts. David Wake (Berkeley) provided helpful review and improved the English text.

REFERENCES

- ABBAZZI L., ANGELONE C., ARCA M., BARISONE G., BEDETTI C., DELFINO M., KOTSAKIS T., MARCOLINI F., PALOMBO M.R., PAVIA M., PIRAS P., ROOK L., TORRE D., TUVERI C., VALLI A. & WILKINS B., 2004 - Plio-Pleistocene fossil vertebrates of Monte Tuttavista (Orosei, E Sardinia, Italy), an overview - *Riv. ital. Pal. Strat.*, Milano, 10 (3): 681-706.
- ALVAREZ W., 1972 - Rotation of the Corsica-Sardinia microplate - *Nature Phys. Sci.*, New York, 235: 103-105.
- BARBADILLO L.J., GARCIA-PARIS M. & SANCHIZ B., 1997 - Origenes y relaciones evolutivas de la herpetofauna ibérica (pp. 47-100) - In: PLEGUEZUELOS J.M.: Distribucion y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal. Monografías de Herpetología, Volumen 3. Asociación Herpetológica Española, Granada, 542 pp.
- BORKIN L.J., 1999 - Distribution of amphibians in North Africa, Europe, Western Asia, and the Former Soviet Union (pp. 329-420) - In: DUELLMAN W.E. (Ed.), Patterns of distribution of amphibians. A global perspective. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 633 pp.
- BRIGGS J.C., 1987 - Biogeography and plate tectonics - Development in Paleontology and Stratigraphy. 10. Elsevier, Amsterdam, 204 pp.
- CACCONE A., MILINKOVITCH M.C., SBORDONI V. & POWELL J.R., 1994 - Molecular biogeography: using the Corsica-Sardinia microplate disjunction to calibrate mitochondrial rDNA evolutionary rates in mountain newts (*Euproctus*) - *J. Evol. Biol.*, Basel, 7: 227-245.
- CALOI L., KOTSAKIS T. & PALOMBO M.R., 1986 - La fauna a vertebrati terrestri del Pleistocene delle isole del Mediterraneo - *Geologica rom.*, Roma, 25: 235-256.
- CHEYLAN M., 1995 - Les reptiles du Paléarctique occidental. Diversité et conservation - Thèse École Pratique des Hautes Études, Montpellier, 525 pp.
- CIMMARUTA R., NASCETTI G., FORTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Paleogeografia della Sardegna ed evoluzione degli *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 182-195.
- DELFINO M., 2002 - Erpetofaune italiane del Neogene e del Quaternario - Doctoral Thesis, Modena e Reggio Emilia University, Modena, 382 pp.
- DELFINO M., 2004 - The middle Pleistocene herpetofauna of Valdemino Cave (Liguria, North-Western Italy) - *Herpet. J.*, London, 14: 113-128.

- DELFINO M., RAGE J.-C. & ROOK L., 2003 - Tertiary mammal turnover phenomena: what happened to the herpetofauna? - *Deinsea*, Rotterdam, 10: 153-161.
- DUBOIS A., 1984 - Miscellanea nomenclatorica batrachologica (IV) - *Alytes*, Paris, 3 (3): 103-110.
- EDWARDS J.L., 1976 - Spinal nerves and their bearing on salamander phylogeny - *J. Morph.*, Philadelphia, 148: 305-328.
- ESTES R., 1981 - Gymnophiona, Caudata - In: Handbuch der Palaoherpetologie, vol. 2. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 115 pp.
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Glaciazioni del Quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 197-211.
- FROMHAGE L., VENCES M. & VEITH M., 2004 - Testing alternative vicariance scenarios in Western Mediterranean discoglossid frogs - *Mol. Phyl. Evol.*, Orlando, 31: 308-322.
- GASC J.-P., CABELA A., CRNOBRNJA-ISAILOVIC J., DOLMEN D., GROSSENBACHER K., HAFFNER P., LESCURE J., MARTENS H., MARTINEZ RICA J.P., MAURIN H., OLIVEIRA M.E., SOFIANIDOU T.S., VEITH M. & ZUIDERWIJK A. (Eds), 1997 - Atlas of amphibians and reptiles in Europe - SEH & MNHN, Paris, 496 pp.
- IVANOV M., RAGE J.-C., SZYNDLAR Z. & VENCZEL M., 2000 - Histoire et origine géographique des faunes de serpents en Europe - *Bull. Soc. herp. Fr.*, Paris, 96: 15-24.
- JACKMAN T.R., APPLEBAUM G. & WAKE D.B., 1997 - Phylogenetic relationships of Bolitoglossine salamanders: a demonstration of the effects of combining morphological and molecular data sets - *Mol. Biol. Evol.*, Chicago, 14 (8): 883-891.
- JOCKUSCH E.L. & WAKE D.B., 2002 - Falling apart and merging: diversification of slender salamanders (Plethodontidae: *Batrachoseps*) in the American West - *Biol. J. Linn. Soc.*, London, 76: 361-391.
- LA GRECA M., 1984 - L'origine della fauna italiana - *Le Scienze*, Milano, 32 (187): 66-79.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G. & BULLINI L., 1995 - Morphologic and genetic studies of the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) - *Monogr. Mus. reg. Sc. nat.*, Torino, 16, 368 pp.
- LANZA B. & VANNI S., 1981 - On the biogeography of plethodontid salamanders (Amphibia, Caudata) with a description of a new genus - *Monit. zool. ital.*, Firenze, 15: 117-121.
- MARINCOVICH JR. L. & GLADENKOV A. YU., 1999. Evidence for an early opening of the Bering Strait - *Nature*, London, 397: 149-151.
- MASINI F., BONFIGLIO L., ABBAZZI L., FERRETTI M., KOTSAKIS T., PETRUSO D., TORRE D., DELFINO M., FANFANI F., MARRA A.C. & STUART A., 2002 - Vertebrate assemblages of central-western Mediterranean islands during the Pliocene and Quaternary: reflecting on extinction events - *Brit. Archaeol. Res. Rep., Int. Ser.* n. 1095, "Vth Deia International Conference of Prehistory", World Island in Prehistory 2001, Mallorca, Spain: 437-444.
- McKENNA M., 1975 - Fossil mammals and Early Eocene North Atlantic continuity - *Ann. Missouri Bot. Gard.*, St. Louis, 62: 335-353.
- MILNER A.R., 2000 - Mesozoic and Tertiary Caudata and Albanerpetontidae (pp. 1412-1444) - In: HEATWOLE H. & CARROL R.L., *Amphibian Biology*. Vol. 4.

- Palaeontology. The Evolutionary History of Amphibians. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, xii + 973-1496.
- MONTIGNY R., EDEL J.B. & THUIZAT R., 1981 - Oligo-Miocene rotation of Sardinia: K-Ar ages and paleomagnetic data of Tertiary volcanics - *Earth Planet. Sci. Lett.*, Amsterdam, 54: 261-271.
- NARDI I., MARRACCI S., LORETI S. & BATISTONI R., 2000 - The European plethodontid salamanders and their evolutionary relationships: a cytomolecular approach - Atti I Congr. Naz. Societas Herpetologica Italica (Torino, 1996), Mus. reg. Sci. nat., Torino: 327-330.
- NASCETTI G., CIMMARUTA R., LANZA B. & BULLINI L., 1996 - Molecular taxonomy of European plethodontid salamanders (genus *Hydromantes*) - *J. Herpet.*, Athens, 30 (2): 161-183.
- POUGH F.H., ANDREWS R.M., CADLE J.E., CRUMP M.L., SAVITZKY A.H. & WELLS K.D., 2001 - Herpetology, Second Edition - Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, xii + 612 pp.
- RAGE J.C., 1984 - La «Grande Coupure» éocène/oligocène et les herpétofaunes (Amphibiens et Reptiles): problèmes du synchronisme des événements paléobiogéographiques - *Bull. Soc. géol. France*, Paris, 26 (6): 1251-1257.
- RAGE J.C., 1986 - The amphibians and reptiles at the Eocene-Oligocene transition in Western Europe: an outline of faunal alterations (pp. 309-310) - In: POMEROL C. & PREMOLI-SILVA I. (Eds.), Terminal Eocene events. Developments in Palaeontology and Stratigraphy, 9. Elsevier, Amsterdam, 414 pp.
- RAGE J.C., 1989 - Origin and history of the Western European herpetofauna - In: HALLIDAY, T., BAKER, J., & HOSIE, L. (Eds.), Abstract book, First World Congress of Herpetology, University of Kent, Canterbury: 1 pag.
- RAGE J.C., 1997 - Paleobiological and paleogeographical background of the European herpetofauna (pp. 23-28) - In: GASC J.-P., CABELA A., CRNOBRNJIA-ISILOVIC J., DOLMEN D., GROSSENBACHER K., HAFFNER P., LESCURE J., MARTENS H., MARTINEZ RICA J.P., MAURIN H., OLIVEIRA M.E., SOFIANIDOU T.S., VEITH M. & ZUIDERWIJK A. (Eds). Atlas of amphibians and reptiles in Europe, SEH & MNHN, Paris, 496 pp.
- RAGE J.C. & AUGE M., 1994 - Squamates from the Cainozoic of the western part of Europe. A review - *Rev. Paléobiol.*, Genève, Vol. spec. 7, (1993): 199-216.
- RAGE J.C. & ROCEK Z., 2003 - Evolution of anuran assemblages in the Tertiary and Quaternary of Europe, in the context of palaeoclimate and palaeogeography - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 24: 133-250.
- RAZZETTI E., BONINI L. & ANDREONE F., 2001 - Lista ragionata di nomi comuni degli Anfibi e dei Rettili italiani - *Ital. J. Zool.*, Modena, 68 (3): 243-259.
- ROCEK Z., 1994 - A review of the fossil Caudata of Europe - *Abhand. Ber. Naturk.*, Magdeburg, 17: 51-56.
- SANCHIZ B., 1997 - Factores causales de biodiversidad: especiación, extinción y migración en la formación de la batracofauna europea (pp. 185-206) - In: AGUIRRE E. *et alii*, (Eds.), Registros fósiles e historia de la Tierra, Ed. Univ. Complutense, Madrid.
- SANCHIZ B., 1998 - Salientia - In: Handbuch der Palaoherpetologie, vol. 4. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York, 275 pp.
- SANCHIZ B. & ROCEK Z., 1996 - An overview of the anuran fossil record (pp. 317-328) - In: TINSLEY R.C. & KOBEL H.R. (Eds.), The Biology of the *Xenopus*.

- The Zoological Society of London, Clarendon Press, Oxford, 464 pp.
- SCHMIDT K.P., 1946 - On the zoogeography of the Holartic Region - *Copeia*, Washington, 1946 (3): 144-152.
- SHER A., 1999 - Traffic lights at the Beringian crossroads - *Nature*, London, 397: 103-104.
- SOCIETAS HERPETOLOGICA ITALICA, 1996 - Atlante provvisorio degli Anfibi e dei Rettili italiani - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 91: 95-178.
- SONDAAR P.Y., BOER DE P.L., SANGES M., KOTSAKIS T. & ESU D., 1984 - First report on a Paleolithic culture in Sardinia - *Brit. Archaeol. Res. Rep., Int. Ser.*, Oxford, 229: 29-47.
- SONDAAR P.Y., MARTINI F., SANGES M., HOFMEIJER G., BERGH G. VAN DER, VISSER J.A. DE, SPOOR C.F., KOTSAKIS T. & ESU D., 1988 - Grotta Corbeddu - In: MARTINI F. (a cura di), Field-trip book, International Conference Early Man in Island Environments, Oliena (Sardinia): 93-115.
- STEFANI R., 1969 - La distribuzione geografica e l'evoluzione del geotritone sardo (*Hydromantes genei* Schleg.) e del geotritone continentale europeo (*Hydromantes italicus* Dunn) - *Arch. zool. ital.*, Napoli, 53: 207-244.
- VENCZEL M., 1999 - Land salamanders of the family Hynobiidae from the Neogene and Quaternary of Europe - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 20: 401-412.
- WAKE D.B., 1966 - Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae - *Mem. South. Calif. Acad. Sci.*, Los Angeles, 4: 1-11.
- WAKE D.B., 1987 - Adaptive radiation of salamanders in Middle American cloud forests - *Ann. Missouri Bot. Gard.*, St. Louis, 74: 242-264.
- WAKE D.B., MAXSON L.R. & WURST G.Z., 1978 - Genetic differentiation, albumin evolution, and their biogeographic implications in plethodontid salamanders of California and Southern Europe - *Evolution*, Lawrence, 32 (3): 529-539.
- WEBB S.D., 1985 - Main pathways of mammalian diversification in North America (pp. 201-217) - In: STEHLI F.G. & WEBB S.D. (a cura di), The great American interchange. Plenum Press, New York, 532 pp.

ABSTRACT

The European fossil record of plethodontids is surprisingly poor (only 6 post-Miocene localities) if one considers that it is rather easy to identify their remains among those of the other caudates that inhabited Europe during the Cenozoic. The facts that European fossils are relatively young, come exclusively from the present range and cannot be identified at species rank, makes them unsuitable to determine the direction of dispersal of Europe from America and apparently useless in resolving the phylogenetic relationships of the modern taxa. Although it is not possible to assess unambiguously the evolutionary weight of contrasting data inferred from biogeography and molecular biology, the absence of relict Asian populations can be interpreted to suggest that a direct spread preceding the separation of Europe and North America (along with the well known mammal and herpetofaunal dispersal) is less unlikely than a dispersal requiring the crossing of the Beringian Bridge and the whole of Asia. There are also reasons to suggest that the continental species of Europe could derive from the eastern Sardinian ones and not the reverse.

RIASSUNTO

Pletodontidi europei: dati paleontologici e considerazioni biogeografiche (Amphibia).

Sebbene sia relativamente semplice riconoscere i resti fossili dei membri della famiglia Plethodontidae da quelli delle altre famiglie di caudati che hanno abitato l'Europa durante il Cenozoico, il loro registro fossile è limitato a 6 località, di cui 5 italiane (4 in Sardegna e 1 in Liguria) e 1 francese (Alpes-Maritimes), non più antiche del Pliocene e localizzate all'interno dell'attuale areale. Inoltre, l'assenza di fossili provenienti dall'Asia e la scarsità di quelli nordamericani (i più antichi risalgono al Miocene inferiore) ostacolano la formulazione di teorie che consentano di spiegare come si siano originati i popolamenti europei di una famiglia altrimenti essenzialmente americana. Inoltre, non è possibile valutare in modo inequivocabile il peso dei molti e contrastanti dati di carattere biogeografico e molecolare. Alcune considerazioni di carattere bio- e paleobiogeografico, fra cui l'assenza di popolazioni relitte di pletodontidi in Asia, sembrano però suggerire che una diffusione verso est (quindi diretta), sulla scia di ben documentate dispersioni faunistiche che hanno interessato sia la mammalofauna sia l'erpetofauna, e precedente alla separazione del Nord America dall'Europa, sia più probabile di una diffusione che richieda l'attraversamento del ponte di Bering e di tutta l'Asia. Inoltre, la possibilità che le specie dell'Europa continentale derivino da quelle della Sardegna orientale sembra l'ipotesi più plausibile.

NOTE ADDED IN PROOFS

An unexpected Plethodontid caudate has been recently found in the Middle Miocene of Slovakia (VENCZEL & SANCHIZ, 2005). This datum widens considerably the past European range of the family but seems not to be sharply in contrast with any of the biogeographical scenarios here reviewed or proposed.

VENCZEL M. & SANCHIZ B., 2005 - A fossil plethodontid salamander from the Middle Miocene of Slovakia (Caudata, Plethodontidae) - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 26: 408-411.

BENEDETTO LANZA*, ROBERTA CIMMARUTA**,
GIANLUCA FORTI***, LUCIANO BULLINI**** & GIUSEPPE NASCETTI**

BIANCHI'S CAVE SALAMANDER,
SPELEOMANTES AMBROSII BIANCHII N. SSP.

(AMPHIBIA, CAUDATA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

NASCETTI *et alii* (1996) and FORTI *et alii* (1998) showed that *Speleomantes ambrosii* (Lanza, 1955) consists of two well differentiated forms ($D_{\text{Nei}}=0.18$) living respectively W and E of the Magra River (NW Italy). The first one, inhabiting the province of La Spezia (Liguria), *terra typica* of the species, corresponds to the nominate taxon *Speleomantes ambrosii ambrosii*, while the second one, typical of the province of Massa-Carrara (Tuscany), has to be described as *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp.

MATERIALS AND METHODS

Genetic variation was investigated in 174 specimens taken from 8 localities covering the whole range of the species. Three localities are inhabited by *S. ambrosii bianchii* and the other five by *S. ambrosii ambrosii* (FORTI *et alii* 1998). An overall number of 33 enzyme

* Dipartimento di Biologia Animale e Genetica & Museo di Storia Naturale (Sezione Zoologica "La Specola"), Università degli Studi di Firenze, Via Romana 17, 50125 Firenze, Italia; e-mail: benedetto.lanza@tin.it

** Dipartimento di Ecologia per lo Sviluppo Economico Sostenibile, Università della Tuscia, Via S. Giovanni Decollato 1, 01100 Viterbo, Italia; e-mail: cimmaruta@unitus.it & nascetti@unitus.it

*** Museo del Fiore, Piazza G. Fabrizio 17, 01021 Acquapendente (VT), Italia; e-mail: museo.fiore@tin.it

**** Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza", Via dei Sardi 70, 00185 Roma, Italia; e-mail: l.bullini@uniroma1.it

Table 1 - The enzymes studied in *S. a. ambrosii* and *S. a. bianchii*, with the encoding loci, the electrophoretic conditions and the staining references. Migration: + = anodal, - = cathodal. Buffer system: 1) Tris-Versene-Borate (BREWER & SING 1970); 2) Tris-Versene-Maleate (BREWER & SING 1970); 3) Phosphate-Citrate (HARRIS 1966); 4) Discontinuous Tris-Citrate (POULIK 1957); 5) Continuous Tris-Citrate (SELANDER *et alii* 1971). Staining references: a) BREWER & SING (1970); b) SHAW & PRASAD (1970); c) SELANDER *et alii* (1971); d) AYALA *et alii* (1972); e) HARRIS & HOPKINSON (1976); f) RICHARDSON *et alii* (1986).

Enzyme	E.C. number	Encoding loci	Migration	Buffer	V/cm	Running time (hr)	Staining ref.
α -Glycerophosphate dehydrogenase Lactate dehydrogenase	1.1.1.8	α -Gpdh	+	3	8	6	d
	1.1.1.27	Ldh-1	+	4	7	5	a
Hydroxybutyrate dehydrogenase	1.1.1.30	Ldh-2	-	2	7	6	b
	1.1.1.37	Hbdh	+	3	8	6	b
Malate dehydrogenase		Mdh-1	+	5	7	6	d
		Mdh-2	+	5	7	5	b
Malate dehydrogenase (NADP+)	1.1.1.40	Mdhp-1	+	3	8	6	b
		Mdhp-2	+	3	8	6	b
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	Idh-1	+	5	7	6	d
	1.1.1.44	Idh-2	+	5	7	5	a
6-Phosphogluconate dehydrogenase		6-Pgdh	+	1	7	7	c
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.2.1.12	Gapdh	+	5	8	6	d
NADH dehydrogenase	1.6.99.3	NADH-dh	+	2	8	8	a
Superoxide dismutase	1.15.1.1	Sod-1	+	1	7	7	c
Nucleoside phosphorilase	2.4.2.1	Sod-2	+	1	8	6	e
	2.6.1.1	Np	+	3	8	5	c
Creatine kinase	2.7.3.2	Aat-1	-	5	7	5	b
	2.7.4.3	Aat-2	+	5	7	5	d
Adenylate kinase	3.1.1.1	Ck	+	4	8	5	d
Esterase	3.4.11.	Adk	+	5	7	4	f
Peptidase (Leu-Ala)	3.4.11.	Est-4	+	5	7	4	f
Peptidase (Phe-Pro)	3.4.11.	Pep-C	+	4	7	4	d
Leucine aminopeptidase	3.4.11.	Pep-D	+	5	7	4	e
Adenosine deaminase	4.2.1.1	Lap	+	1	7	4	e
Carbonic anhydrase	4.2.1.2	Ada-1	+	1	7	6	b
	5.3.1.8	Ada-2	+	1	7	6	e
Fumarase	5.3.1.9	Ca-2	+	3	8	6	c
Mannose phosphate isomerase	5.4.2.2	Ca-3	+	3	8	6	c
Glucose phosphate isomerase		Fum	+	3	8	6	c
Phosphoglucomutase		Mpi	-	3	8	6	c
		Gpi	+	3	8	6	c
		Pgm-1	+	3	8	6	c
		Pgm-2	+	3	8	6	c

The morphological data reported in the present paper, unless specified otherwise, refer only to adults, to avoid the variation due to allometric growth or to other types of ontogenetic changes. Measurements and counting methods were as follows:

total length (tl) (only in the specimens with tail unregenerated or seemingly so);

body length (bl)= snout tip-anterior end of the vent;

axilla-groin (ag);

tail length (tal)= total length minus body length;

head length (hl)= snout tip-oral angle (marked by a thin needle);

head width (hw)= between the oral angles, each marked by a thin needle;

head depth (hd)= distance between the tangent of the lower jaw and the highest point of the head;

lower lip-gular fold (lg)= distance between the midpoint of the lower lip and the midpoint of the gular fold;

snout length (sl)= from the midpoint of the upper lip border to the anterior eyelid commissure;

internarial distance (id)= shortest distance between the median margins of the narial openings;

orbitonarial distance (od)= between the posterior border of the narial openings and the anterior eyelid commissure;

intercanthal distance (icd)= between each anterior eyelid commissure;

interorbital distance (iod)= the shortest distance between the medial margin of the upper eyelids;

eye diameter (ed)= distance between anterior and posterior eyelid commissures;

mental gland width (mgw)= its greatest width;

mental gland length (mgl)= from the anterior midpoint, just behind the mandibular symphysis, to the midpoint of the posterior border (when the latter is concave, to the midpoint of the tangent touching its posteriormost points);

snout-epibranchial tip (se)= distance between the tip of the snout and the posterior end of the epibranchial sheath with the tongue at rest position (the end of the sheath exposed by dissection);

foreleg length (fl)= from its anterior attachment to the tip of the 3rd finger;

hind leg length (hil)= from the groin to the tip of the longest toe;
 foot length (fol)= from the inner border of the foot to the tip of the
 4th toe, the latter at 90° against the inner margin of the foot (cf.
 LANZA *et alii* 1995, fig. 1);

teeth number (approximate)= tooth counts are based on the visible
 teeth, i.e. on the functional, ankylosed teeth, as well as on those
 not yet functional but almost piercing the mucous membrane
 and about to replace the lost ones (on one side; of course teeth
 lacking due to traumatism were also counted as present) (pm=
 premaxillar teeth; av= anterior vomerine teeth; m= maxillary
 teeth; ma= mandibular teeth);

trunk vertebrae (tv)= number of the trunk vertebrae (i.e. of the pre-
 sacral vertebrae, atlas excluded), usually counted on radiographs,
 sometimes in skeletonized and double-stained animals;

postsacral vertebrae (pv)= number of the sacro-caudal and caudal
 vertebrae, comprising the smallest apical, radiographically
 detectable elements.



Fig. 1 - *Speleomantes ambrosii ambrosii*; ♀ 23323 MZUF (formerly 294 NHCL = New Herpetological Collection Lanza); Grotta dei Pitalli (= Grotta dell'Ospizio), cadastral number 1214 Li/SP, 100 m a.s.l. [44°07'15"N-02°39'21"W (Rome)= 09°47'47"E Greenwich]; locality Chiappa; province and municipality of La Spezia; leg. S. Vanni & P. Magrini, 17.IX.1989 (photo Stefano Vanni).

The following ratios were taken: 1= total length: tail length; 2= body length: axilla-groin; 3= body length: foreleg length; 4= body length: hind leg length; 5= hind leg length: foreleg length; 6= body length: head length; 7= body length: head width; 8= body length: lower lip-gular fold; 9= body length: foot length; 10= body length: mental gland width; 11= body length: mental gland length; 12= mental gland width: mental gland length; 13= body length: snout-epibranchial tip; 14= head length: head width; 15= head length: head depth; 16= head length: snout length; 17= head length: internarial distance; 18= head length: orbitonarial distance; 19= head length: intercanthal distance; 20= head length: interorbital distance; 21= head length: eye diameter; 22= internarial distance: interorbital distance.

Since the genome of most populations of *S. a. bianchii* is more or less introgressed by genes of *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) (see especially RUGGI *et alii* 2005), we chose to describe morphologically the new taxon only on the basis of the westernmost “pure” populations of the province of Massa-Carrara, i.e. those from Pùlica-Marciaso’s zone (see “Results” for the material’s list).

Morphology and pattern of *S. ambrosii bianchii* from Pùlica-Marciaso’s area have been compared with those of the following 30 parapatric specimens of *S. ambrosii ambrosii*, all collected in the type locality and environs (eastern end of the province of La Spezia; Liguria); all the specimens quoted in the present paper belong to the collections of the Museo Zoologico dell’Università di Firenze (MZUF) and numbers are referred to the catalogue of MZUF, but two paratypes of *S. ambrosii bianchii* which are deposited in the collection of the Museo Civico di Storia Naturale “G. Doria” of Genoa (MSNG); c.n.= cadastral number of the caves:

♀♀ 13609, Manarola, along the path to Corniglia (Cinqueterre), leg. S. Taiti, 28.XII.1980;

3 ♂♂ 1723, 1724 and 1725, ♀ 1726 (paratypes of *Hydromantes italicus ambrosii*), cave Sprugola di Monte Tenero (= Caverna di Monte Tenero n. 1), c.n. 236 Li/SP, 44°07’42”N-02°40’28”W(Rome), 250 m, leg. A. C. Ambrosi, 11.VII.1953;

3 ♀♀ 1716, 1717 and 1718 (paratypes), cave Caverna della Taggia (= Antro del Pantano; Sprugola della Taggia), c.n. 79 Li/SP, 44°06’03”N-02°39’47”W (Rome), 210 m, locality Colle Matellina, near Pegazzano, leg. A. C. Ambrosi, IV.1953;

Table 2 - Statistical analysis of 22 morphological ratios in *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. from Pùlica and *S. ambrosii ambrosii* from La Spezia
t=Student's test. Ratios are defined in the section Materials and Methods.

Locality	Sex	n	Ratio	Range	Mean	cl (99%)	t	df	P
Spezia	♂♂	10	1	2.20-2.41	2.32±0.074	2.25-2.39			
							3.32	24	<0.01
Pùlica	♂♂	16	1	2.15-2.33	2.24±0.057	2.19-2.28			
Spezia	♀♀	15	1	2.14-2.42	2.31±0.067	2.26-2.37			
							2.92	19	<0.01
Pùlica	♀♀	6	1	2.11-2.31	2.22±0.073	2.09-2.34			
Spezia	♂♂	12	2	1.86-2.07	1.98±0.057	1.93-2.03			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	2	1.88-2.09	1.99±0.065	1.94-2.04			
Spezia	♀♀	18	2	1.78-2.00	1.90±0.056	1.86-1.93			
							3.40	23	<0.01
Pùlica	♀♀	7	2	1.85-2.13	1.99±0.091	1.87-2.12			
Spezia	♂♂	12	3	3.08-3.43	3.26±0.103	3.17-3.35			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	3	2.91-3.40	3.20±0.121	3.11-3.29			
Spezia	♀♀	18	3	2.88-3.54	3.31±0.160	3.20-3.42			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	3	3.21-3.45	3.31±0.086	3.19-3.43			
Spezia	♂♂	12	4	2.95-3.36	3.12±0.118	3.01-3.23			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	4	2.86-3.38	3.11±0.160	3.00-3.23			
Spezia	♀♀	18	4	2.82-3.41	3.12±0.167	3.01-3.24			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	4	3.00-3.24	3.16±7.900	3.04-3.27			
Spezia	♂♂	12	5	0.97-1.10	1.05±0.042	1.01-1.08			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	5	0.93-1.1	1.03±0.044	0.99-1.06			
Spezia	♀♀	18	5	1.00-1.12	1.06±0.038	1.03-1.08			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	5	1.02-1.07	1.05±0.022	1.02-1.08			
Spezia	♂♂	9	6	5.05-5.39	5.27±0.107	5.15-5.39			
							4.48	23	<0.01
Pùlica	♂♂	16	6	5.31-5.90	5.54±0.167	5.42-5.67			
Spezia	♀♀	10	6	5.22-5.82	5.50±0.228	5.27-5.74			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	6	5.33-5.90	5.69±0.192	5.42-5.96			
Spezia	♂♂	9	7	5.68-6.19	5.92±0.208	5.69-6.15			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	7	5.35-6.49	6.11±0.314	5.88-6.34			

Table 2 - (continued) Statistical analysis of 22 morphological ratios in *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. from Pùlica and *S. ambrosii ambrosii* from La Spezia. Ratios are defined in the section Materials and Methods.

Spezia	♀♀	10	7	5.69-6.38	5.96±0.198	5.76-6.17			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	7	5.70-6.10	5.88±0.126	5.71-6.06			
Spezia	♂♂	12	8	3.94-4.54	4.22±0.217	4.02-4.41			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	8	3.22-4.55	4.18±0.286	3.97-4.39			
Spezia	♀♀	13	8	3.88-4.61	4.23±0.204	4.06-4.40			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	8	4.11-4.35	4.26±0.087	4.13-4.38			
Spezia	♂♂	12	9	7.20-8.21	7.62±0.290	7.36-7.88			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	9	7.05-8.16	7.50±0.294	7.29-7.72			
Spezia	♀♀	18	9	7.16-8.51	7.80±0.403	7.52-8.07	2.13	23	<0.05
Pùlica	♀♀	7	9	7.06-8.26	7.40±0.419	6.82-7.99			
Spezia	♂♂	12	10	13.17-16.87	14.81±1.112	13.81-15.81			
							5.30	26	<0.01
Pùlica	♂♂	16	10	11.22-14.88	12.62±1.055	12.06-13.40			
Spezia	♂♂	12	11	18.00-22.92	21.62±1.518	20.26-22.90			
							9.23	26	<0.01
Pùlica	♂♂	16	11	15.14-18.71	17.47±0.847	16.84-18.09			
Spezia	♂♂	12	12	1.02-1.68	1.42±0.163	1.28-1.57			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	12	1.17-1.58	1.39±0.106	1.31-1.47			
Spezia	♂♀	20	13	1.78-2.15	1.97±0.130	1.88-2.05			
							3.45	38	<0.01
Pùlica	♂♀	20	13	1.88-2.29	2.10±0.117	2.03-2.17			
Spezia	♂♂	9	14	1.06-1.18	1.12±0.039	1.08-1.17			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	14	1.03-1.17	1.11±0.042	1.08-1.14			
Spezia	♀♀	10	14	1.03-1.15	1.08±0.037	1.05-1.12	4.17	21	<0.01
Pùlica	♀♀	7	14	1.00-1.08	1.04±0.030	0.99-1.08			
Spezia	♂♂	9	15	1.89-2.51	2.25±0.194	2.03-2.47			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	15	1.70-2.52	2.10±0.232	1.93-2.27			
Spezia	♀♀	10	15	2.00-2.28	2.16±0.083	2.08-2.25			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	15	1.89-2.35	2.13±0.157	1.91-2.35			

Table 2 - (continued) Statistical analysis of 22 morphological ratios in *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. from Pùlica and *S. ambrosii ambrosii* from La Spezia. Ratios are defined in the section Materials and Methods.

Spezia	♂♂	9	16	2.12-2.48	2.30±0.126	2.16-2.44			
							2.14	23	<0.05
Pùlica	♂♂	16	16	2.00-2.32	2.21±0.081	2.15-2.27			
Spezia	♀♀	10	16	2.19-2.44	2.29±0.083	2.21-2.38			
							3.27	15	<0.01
Pùlica	♀♀	7	16	2.04-2.32	2.15±0.097	2.01-2.28			
Spezia	♂♂	9	17	2.89-3.50	3.09±0.185	2.89-3.30			
							4.50	23	<0.01
Pùlica	♂♂	16	17	2.60-3.10	2.81±0.136	2.71-2.90			
Spezia	♀♀	10	17	2.91-3.41	3.16±0.149	3.01-3.31			
							2.31	15	<0.05
Pùlica	♀♀	7	17	2.78-3.29	2.98±0.179	2.73-3.23			
Spezia	♂♂	9	18	3.43-3.92	3.70±0.168	3.50-3.88			
							5.50	23	<0.01
Pùlica	♂♂	16	18	2.54-3.48	3.22±0.225	3.05-3.38			
Spezia	♀♀	10	18	3.30-3.89	3.65±0.220	3.43-3.88			
							3.38	15	<0.01
Pùlica	♀♀	7	18	2.97-3.57	3.29±0.222	2.98-3.60			
Spezia	♂♂	9	19	2.12-2.41	2.25±0.110	2.13-2.37			
							3.69	23	<0.01
Pùlica	♂♂	16	19	1.94-2.30	2.10±9.999	2.03-2.17			
Spezia	♀♀	10	19	2.06-2.43	2.18±0.105	2.07-2.29			
							2.90	15	<0.02
Pùlica	♀♀	7	19	1.83-2.27	2.01±0.137	1.82-2.20			
Spezia	♂♂	9	20	3.25-3.92	3.60±0.196	3.39-3.83			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	20	3.00-4.00	3.49±0.321	3.25-3.72			
Spezia	♀♀	10	20	3.25-4.04	3.61±0.259	3.34-3.87			
							3.26	15	<0.01
Pùlica	♀♀	7	20	2.81-3.57	3.18±0.274	2.80-3.57			
Spezia	♂♂	9	21	2.61-2.97	2.83±0.122	2.70-2.97			
							2.71	23	<0.02
Pùlica	♂♂	16	21	2.82-3.25	2.97±0.123	2.88-3.06			
Spezia	♀♀	10	21	2.64-3.00	2.84±0.105	2.73-2.95			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	21	2.68-2.94	2.81±0.084	2.69-2.93			
Spezia	♂♂	12	22	1.03-1.35	1.16±0.100	1.07-1.25			
							no significance		
Pùlica	♂♂	16	22	1.04-1.44	1.24±0.124	1.14-1.33			
Spezia	♀♀	14	22	0.96-1.30	1.14±0.091	1.06-1.21			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	22	0.93-1.28	1.07±0.136				

4 ♂♂ 15943, 15945, 15946 and 15947, 4 ♀♀ 15942, 15944, 15948 and 15949, outdoors, close to the above-mentioned cave, 150-220 m, leg. B. Lanza, P. Finotello & P. Malenotti, 14.II.1982; 4 ♂♂ 19674, 19675, 19676 and 19677, ♀ 19679, *ibidem*, leg. B. Lanza & G. Tosini, 18.XII.1989;

♂ 15965, ♀ 15964, La Spezia (in the town, under stones beside the road to Bocca Lupara), ca. 80 m, leg. S. Vanni & P. Magrini, 2.IV.1985;

♀ 1727 (holotype), and 3 ♀♀ 1728, 1729 and 1730 (paratypes), cave Sprugola della Cornese (= Sprugola la Canese), c.n. 186 Li/SP, 44°05'15"N-02°39'14"W (Rome), near Fabiano, 240 m, leg. A. C. Ambrosi, 23.IX.1952;

♂ 1584, Ceppo, ca. 500 m SW of Fabiano (SP), leg. G. Pini, 31.X.1954;

3 ♀♀ 1623, 1624 and 1625 (paratypes), cave La Paladina, c.n. 1208 Li/SP, 44°05'02"5N-02°38'21"W (Rome), Capoacca Valley, Coregna on the Mt Castellano, 240 m, leg. A. C. Ambrosi, III and IV.1953.

RESULTS

Speleomantes ambrosii bianchii n. ssp. (figs 2-6)

Holotype: Adult ♂ 26107 (formerly 4452 New Herpetological Collection Lanza = NHCL); cave Tana (or Buca) della Bastiòla, c.n. 481 T/MS, 44°08'08"N-02°24'08"W (Rome), on the N slope of Mt Bastione (698 m) and on the left side of the Rio Grande, about 1.2 km SSE of Pùlica (church) and 2.3 km E of Fosdinovo, 360 m (municipality of Fosdinovo; locality Rio Grande); leg. B. Lanza & S. Angelotti, 11.X.1997.

Paratypes - 65 specimens as follows:

- same locality as holotype, ♂ 1884, 2 ♀♀ 1883 and 1885, leg. T. Bianchi & B. Lanza, 18.X.1942; ♀ 6611, leg. B. Lanza, 28.X.1945; 9 juv. 1874, 1875, 1876, 1877, 1878, 1879, 1880, 1881, 1882, leg. E. Bianchi, 10.VI.1952; juv. 5225, ♂ 5223, ♀ 5224, leg. B., L., & M. Lanza, 19.IV & 24.V.1970; ♂ 17123, leg. S. Vanni, 2.I.1986; juv. 19159, young ♂ 19161, 5 ♂♂ 19154, 19155, 19156, 19157 and 19160, ♀ 19158, leg. S. Vanni & R. Cimmaruta, 23.IV.1987;

- 3 juv. 23230, 23231 and 23232 (281-283 NHCL), 5 ♂♂ 23233, 23234, 23235, 23236 and 23237 (284-288 NHCL), 1 ♀ 23238 (289 NHCL), leg. B. Lanza & T. Bianchi, 26.III.1989; 4 juv. 23307, 23308, 23309 and 23310 (3849-3852 NHCL), 2 ♂♂ 23303 and 23304 (3845-3846 NHCL), 2 ♀♀ 23305 and 23306 (3847-3848 NHCL), leg. S. Vanni & B. Lanza, 16.VI.1995; very young spec. 26106 (4451 NHCL), ♂ 26109 (4454 NHCL) now 52716 in MSNG, ♀ 26108 (4453 NHCL), B. Lanza & P. Giorgio Lanza, 22.XI.1997; juv. 26115 (4656 NHCL), 3 ♂♂ 26110, 26111 and 26112 (4651-4653 NHCL), 2 ♀♀ 26113 and 26114 (4654-4655 NHCL), leg. B. Lanza, S. Vanni & G. Nistri, 4.VI.1999;
- cliffs near the confluence, ca. 44°08'02"N-02°24'10"W(Rome), of



Fig. 2 - *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp.; juv. 26115 MZUF (formerly 4656 NHCL); Tana della Bastiola, 4.VI.1999 (anaesthetized specimen, submerged in water; photo Saulo Bambi).

the Rio della Calda with the Rio Grande, of which Rio della Calda is a left tributary, ca. 1.3 km SSE of Pùlica (church), ca. 300 m (mun. of Fosdinovo; upper valley of the Torrente Pésciola), 4 juv. 26119, 26120, 26121 and 26122 (4660-4663 NHCL), ♂ 26116 (4657 NHCL), ♀ 26117 (4658 NHCL) and ♀ 26118

(4659 NHCL) now 52717 in MSNG, leg. B. Lanza & P. Malenotti, 12.X.1998;

- Grotta del Paradisi, c.n. 831 T/MS, 44°08'02"N-02°24'09"W (Rome), 310 m (probably wrongly named Grotta del Ferdì or Grotta del Fredì; with a level indication of 360 m, in the Tuscan Speleological Cadastre; actually the Grotta del Ferdì seems to be a deep well of the same zone, with no c.n., not far from the Grotta del Paradisi); ca. 1.3 km SSE of Pùlica (church) (mun. of Fosdinovo; upper valley of the Torrente Pésciola), ♂ 17124; B. Lanza, S. Vanni & R. Cimmaruta, 23.III.1986; young ♂ 19165, 3 ♂♂ 19162, 19163 and 19164, leg. S. Vanni & R. Cimmaruta, 23.IV.1987;

Table 3 - Teeth number of *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. from Pùlica and of *S. ambrosii ambrosii* from La Spezia. pm= premaxillar teeth; av= anterior vomerine teeth; m= maxillary teeth; ma= mandibular teeth; G=G-test.

Locality	Sex	n	Teeth	Range	Mean	cl (99%)	G	df	P
Spezia	♂♂	12	pm	1-4	2.50±1.000	1.60-3.40			
							no significance		
Pùlica	♂♂	11	pm	1-2	1.91±0.302	1.62-2.20			
Spezia	♀♀	18	pm	2-6	4.56±1.042	3.84-5.27			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	pm	3-5	3.86±0.690	2.89-4.82			
Spezia	♂♂	12	av	4-19	16.33±1.614	14.89-17.78			
							no significance		
Pùlica	♂♂	11	av	13-18	15.18±1.834	13.43-16.93			
Spezia	♀♀	15	av	14-25	18.40±2.823	16.23-20.57			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	av	11-17	15.00±2.170	12.08-17.92			
Spezia	♂♂	12	m	23-30	25.83±2.368	23.71-27.96			
							23.877	8	<0.01
Pùlica	♂♂	11	m	16-22	0.09±1.868	18.31-21.88			
Spezia	♀♀	18	m	20-38	29.11±4.575	25.99-32.24			
							16.563	13	<0.05
Pùlica	♀♀	7	m	18-24	21.86±2.478	18.38-25.33			
Spezia	♂♂	12	ma	30-42	35.17±3.950	31.62-38.71			
							no significance		
Pùlica	♂♂	11	ma	31-37	33.09±2.071	31.11-35.07			
Spezia	♀♀	18	ma	30-46	38.06±4.633	34.89-41.22			
							no significance		
Pùlica	♀♀	7	ma	27-38	32.86±4.741	26.21-39.50			

- left side of the stream Canale Pescioletta, 44°07'00"N-02°23'00"W (Rome), 2 km E of Pùlica and 1 km SW of Marciaso, ca. 580 m (mun. of Fosdinovo), 2 ♂♂ 18520 and 18521, leg. P. Agnelli, B. Campolmi, B. Lanza & P. Giorgio Lanza, 4.IV.1987.

D e r i v a t i o n o m i n i s - We are pleased to dedicate this subspecies to Dr. Tancredi Bianchi (Massa, born on 18.I.1924), odontologist, who, alongside with the senior author, collected the first specimens of the new taxon on the 18th of October 1942, in the course of a biospeleological campaign on the Apuan Alps.

D i a g n o s i s - A *Speleomantes ambrosii* distinguishable with certainty from the whole complex of the nominate form by multilocus electrophoresis only. The two subspecies are indeed genetically completely differentiated at four diagnostic loci: *Pgm-2*, *NADH-dh*, *Sod-1* and *Ada-1*. Nevertheless, *S. ambrosii bianchii* may be usually distinguished from the parapatric *S. ambrosii ambrosii* by its colouration, since it lacks the dorsal pattern of the “*ambrosii*-type” frequently occurring in the animals inhabiting La Spezia and its surroundings (fig. 1; see also LANZA *et alii* 1995, figs 97-99, 100 (right), 101-102); in this pattern type the back is usually monochrome, brown to blackish, aside from the presence of two light, usually ochreous yellow, often more or less discontinuous dorsolateral stripes (fig. 1). Morphological characters usually significantly different in *S. a. ambrosii* and *S. a. bianchii* (see below) are not discriminant, due to the more or less broad overlapping of their independent deviations from the mean; the ratios 10 (body length : mental gland width) and 11 (body length : mental gland length), where only a scarce overlapping occurs, could deserve further research on more specimens.

D e s c r i p t i o n o f t h e h o l o t y p e (figs 3-4) - External morphology corresponding to that of the species (LANZA *et alii* 1995: 44-45). Head moderately depressed (head width: head depth = 1.88), its posterior portion feebly convex; snout obtusely truncate (this character feebly or not appreciable in the fig. 3!). Measurements (in mm) and ratios: tl= 107; bl= 61; ag= 31.6; tal= 46; hl= 10.6; lg= 13.4; sl= 4.8; id= 3.7; od= 3.5; icd= 4.9; iod= 3.3; ed= 3.7; mgw= 4.1; mgl= 3.5; se= 2.15; fl= 18.6; hil= 19.1; fol= 8.0; 1= 2.33; 2= 1.93; 3= 3.28; 4= 3.19; 5= 1.03; 6= 5.75; 7= 6.49; 8= 4.55; 9= 7.63; 10= 14.88; 11= 17.43; 12= 1.17; 13= 2.15; 14= 1.13; 15= 2.12; 16= 2.21; 17= 2.86; 18= 3.03; 19= 2.16; 20= 3.21; 21= 2.86; 22= 1.12.



Fig. 3 - *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp.; left to right: ♂ 26107 MZUF (formerly 4452 NHCL, holotype), juv. 26106 MZUF (4451 NHCL), ♂ 26109 MZUF (4454 NHCL) now 52716 in MSNG, ♀ 26108 MZUF (4453 NHCL); Tana della Bastiola, 11.X.1997 (26107 MZUF) and 22.XI.1997 (dorsal view; anaesthetized specimens, submerged in water; photo Saulo Bambi).

Approximate number of teeth on each side: 2 pm, 16 av, 16 m, 32 ma.

Dorsal parts with very reduced dark ground colour, a rather uniform and thick light brown to ochreous brown marbling, and a hint of strongly discontinuous ochreous yellow dorsolateral stripes; a very irregular black V on the neck. Ventral parts dark bistre, dusted and speckled with off-white dots.

Description of the paratypes (figs 2-4) - Their morphological characters, apart from sex and age differences peculiar to the genus, correspond well to those of the holotype. The specimens of *S. ambrosii ambrosii* from La Spezia and environs

(holotype included) and *S. ambrosii bianchii* from Pùlica-Marciaso and environs (holotype included) show the characters reported in tables 2, 3 and 4.

Table 4 - Number of vertebral elements of *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. from Pùlica and of *S. ambrosii ambrosii* from La Spezia. tv = trunk vertebrae, pv = postsacral vertebrae.

Locality	Sex	n	Vertebrae	Range	Mean	cl (99%)	G	df	P
Spezia	♂♀	37	tv	13-14	13.32±0.475	13.12-13.53			
							no significance		
Pùlica	♂♀	19	tv	13-14	13.21±0.419	12.93-13.49			
Spezia	♂♀	33	pv	23-28	25.79±1.244	25.23-26.35			
							no significance		
Pùlica	♂♀	18	pv	25-27	25.83±0.718	25.35-26.32			



Fig. 4 - *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp.; same specimens of fig. 3, ventral view (anaesthetized specimens, submerged in water; photo Saulo Bambi).

The following ratios and the approximate tooth number turned out to be significantly different between ♂♂ and ♀♀ of the same locality: 2 ($P < 0.01$ Spezia), 3 ($P < 0.05$ Pùlica), 6 ($P < 0.02$ Spezia), 14 ($P < 0.05$ Spezia), $P < 0.02$ Pùlica), 17 ($P < 0.02$ Pùlica), 20 ($P < 0.01$ Pùlica), 21 ($P < 0.01$ Pùlica), 22 ($P < 0.02$ Pùlica), pm ($P < 0.01$ Spezia and Pùlica), m ($P < 0.05$ Spezia and Pùlica), ma ($P < 0.05$ Pùlica).



Fig. 5 - *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp.; left to right: ♀ 26113 MZUF (formerly 4654 NHCL), ♀ 26116 MZUF (4657 NHCL), ♂ 26112 MZUF (4653 NHCL), ♂ 26111 MZUF (4652 NHCL), ♂ 26110 MZUF (4651 NHCL); Tana della Bastiola, 4.VI.1999 (dorsal view; anaesthetized specimens, submerged in water; photo Saulo Bambi).

Dorsal colour pattern rather variable, usually similar to that of the holotype (fig. 3), but sometimes recalling that of some *S. italicus* (Dunn), with ground colour abundant or prevailing and ochreous yellow blotches, or the so called “*gormani*”-type, with the dark ground almost completely hidden by an ochreous yellow to ochreous brown colouration. Ventral parts very variable (fig. 3); ground colour dark brown to dark bistre with a pattern of “*italicus*”-type, “*gormani*”-type or intermediate (according to LANZA *et alii* 1995:

45: “1)“*italicus*”-type: dark ground colour dusted or closely dotted with white or off-white; 2) “*gormanii*”-type: dark ground colour with white or off-white, more or less sparse spots and/or vermiculations; occasionally the white guanophores prevail over the dark ground colour”). Especially worthy of mention the tendentially melanic adult ♂ 26116, blackish and spotless dorsally, dark bistre ventrally with thick whitish dots on the throat and a dozen whitish dots on the belly (fig. 6).



Fig. 6 - *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp.; left to right: ♂ 26116 MZUF (formerly 4657 NHCL), ♀ 26118 (4659 NHCL) now 52717 in MSNG, ♀ 26117 MZUF (4658 NHCL), juv. 26121 MZUF (4662 NHCL), juv. 26120 MZUF (4661 NHCL), juv. 26122 MZUF (4663 NHCL), juv. 26119 MZUF (4660 NHCL); cliffs near the confluence [ca. 44°08'02"N-02°24'10"W(Rome)] of the Rio della Calda with the Rio Grande, near Pùlica, 10.XII.1998 (ventral view; anaesthetized specimens, submerged in water; photo Saulo Bambi).

For further morphological data on other populations of the species see LANZA *et alii* (1995; tables V, p. 69, and VI, pp. 71-93, local samples signed respectively CS for *S. ambrosii ambrosii* and FO for *S. ambrosii bianchii*; table XXXI, pp. 216-224 for the animals of the hybrid zone between *S. ambrosii bianchii* and *S. italicus*).

CONCLUSIONS

As already hypothesized by NASCETTI *et alii* (1996: 165), the evident lack of gene exchange between the two subspecies of *S. ambrosii* seems to be related to the extrinsic geographic barriers represented by the Magra River and, probably, by unfavourable ecological conditions in the upper course of the river, as suggested by the presumable absence of the genus *Speleomantes* from Pontremoli's area E of the Magra River.

According to the same authors, "plethodontid salamanders have provided instances of high genetic divergence associated with low morphological differentiation" (see also, among others, WAKE *et alii* 1978), what implies that some taxa may be identified only after genetic analyses. Nonetheless some taxa result to be identifiable also on a morphological basis where sympatry between species or parapatry between subspecies occur. The first possibility may be exemplified by the paradigm case of the North-american *Plethodon dorsalis* Cope and *P. websteri* Highton whose colour pattern differs only in sympatry (HIGHTON 1979); the second one is well illustrated by the case of *Speleomantes ambrosii ambrosii* and *S. ambrosii bianchii*.

REFERENCES

- AYALA F.J., POWELL J.R., TRACEY M.L., MOURÃO C.A. & PÉREZ-SALAS S., 1972 - Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni* - *Genetics*, Baltimore, 70: 113-139.
- BREWER G.J. & SING C.F., 1970 - An introduction to isozyme techniques - Academic Press, New York and London, 186 pp.
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Glaciazioni del Quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 197-211.
- HARRIS H., 1966 - Enzyme polymorphism in man - *Proc. Roy. Soc. London, ser. B*, London, 164: 298-310.
- HARRIS H. & HOPKINSON D.A., 1976 - Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics - North Holland Publishing Company Inc., New York, 284 pp.
- HIGHTON R., 1979 - A new cryptic species of salamander of the genus *Plethodon* from the south-eastern United States (Amphibia; Plethodontidae) - *Brimleyana*, Raleigh, 1: 31-36.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G. & BULLINI L., 1995 - Morphologic and genetic studies of the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) - *Monogr. Mus. reg. Sci. nat.*, 16, Torino, 368 pp.

- NASCETTI G., CIMMARUTA R., LANZA B. & BULLINI L., 1996 - Molecular taxonomy of European plethodontid salamanders (Genus *Hydromantes*) - *J. Herpet.*, Athens, 30 (2): 161-183.
- POULIK M.D., 1957 - Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers - *Nature*, London, 180: 1477.
- RUGGI A., CIMMARUTA R., FORTI G. & NASCETTI G., 2005 - Preliminary study of a hybrid zone between *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) and *S. ambrosii* (Lanza, 1955) on the Apuan Alps, using RFLP analysis (Amphibia, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 97: 135-144.
- RICHARDSON R.H., BAVERSTOCK P.R. & ADAMS M., 1986 - Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies - Academic Press, Australia, 410 pp.
- SHAW C.R. & PRASAD R., 1970 - Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes - *Biochem. Genet.*, Dordrecht, 4: 297-320.
- SELANDER R.K., SMITH M.H., YANG S.Y., JOHNSON W.E. & GENTRY J.B., 1971 - Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I: Variation in the old-field mouse (pp. 49-90) - In: Studies in genetics - Univ. Texas Publ. Austin, 7013, 6.
- WAKE D.B., MAXSON L.R. & WURST G.Z., 1978 - Genetic differentiation, albumin evolution, and their biogeographic implications in plethodontid salamanders (genus *Hydromantes*) of California and southern Europe - *Evolution*, Lancaster, 32 (3): 529-539.

ABSTRACT

The Authors describe Bianchi's Cave Salamander, *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp., endemic to the Province of Massa-Carrara (NW Tuscany; central Italy), East of the Magra River.

The new subspecies differs from the nominate one, *S. ambrosii ambrosii*, occurring West of the Magra River in the Province of La Spezia (E Liguria), especially from a genetic point of view.

A research on 33 enzyme loci, analysed by means of multilocus allozyme electrophoresis, showed that the two subspecies are genetically completely differentiated at four diagnostic loci; nevertheless, *S. ambrosii bianchii* may be usually distinguished from the parapatric *S. ambrosii ambrosii* by its dorsal pattern. The lack of gene exchange between the two taxa seems to be related to the extrinsic geographic barriers represented by the Magra River and, probably, by unfavourable ecological conditions in the upper course of the river, as suggested by the likely absence of the genus *Speleomantes* from Pontremoli's area East of the Magra River.

RIASSUNTO

Il geotritone di Bianchi, *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. (Amphibia, Caudata, Plethodontidae)

Gli autori descrivono il geotritone di Bianchi (*Speleomantes ambrosii bianchii*), nuova sottospecie propria delle Alpi Apuane della provincia di Massa-Carrara (Toscana NW), distinguibile dal complesso della sottospecie nominale [*S. ambrosii ambrosii* (Lanza, 1955)] solo dal punto di vista genetico, essendo differenziata a livello di quattro loci diagnostici; essa è tuttavia differenziabile di regola anche a livello morfologico dalle popolazioni parapatriche della sottospecie nominale per il diverso disegno dorsale. L'assenza di flusso genico fra i due taxa sembra da mettere in relazione a barriere estrinseche geografiche, nella fattispecie rappresentate dal Fiume Magra e probabilmente da zone ecologicamente sfavorevoli nel tratto superiore del corso d'acqua.

RES LIGUSTICAE CCXLVII

ENRICO BURIOLA*, MAURO VALERIO PASTORINO** & FRANCO BONA*

DISTOICHOMETRA ITALICA N. SP. (CESTODA,
NEMATOTAENIIDAE), PARASSITA DEL GEOTRITONE
EUROPEO *SPELEOMANTES STRINATII*
(AELLEN, 1958) IN LIGURIA

INTRODUZIONE

In alcuni esemplari di *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958), provenienti da tre stazioni inedite dell'Appennino genovese, è stata rinvenuta una nuova specie di Cestode particolarmente interessante per la morfologia e per l'ospite. Sono poche infatti le specie di Cestodi conosciute nei Plethodontidae e tutte in ospiti nordamericani, se si eccettua *Nematotaenia minor* Ricci, 1988, un unico esemplare adulto reperito in *Speleomantes flavus* (Stefani, 1969) in Sardegna. Tutti appartengono ai Nematotaeniidae Lühe, 1910, una piccola famiglia di Ciclofillidei (comprendenti forme parassite da adulti in rettili e anfibi che, secondo la revisione più recente (JONES, 1987), sarebbe costituita da sole diciotto specie suddivise in quattro generi: *Nematotaenia* Lühe, 1910; *Cylindrotaenia* Jewell, 1916; *Distoichometra* Dickey, 1921 e *Bitegmen* Jones, 1987. Dei quattro, *Nematotaenia* è l'unico genere finora conosciuto in Europa. Delle diciotto specie complessive solo tre o quattro sono state osservate in Pletodontidi: *Distoichometra bufonis* Dickey, 1921, specie unica del genere, presente anche in Anuri, *Cylindrotaenia americana* Jewell, 1916, più volte citata nei Pletodontidi, ma che JONES (1987) considera parassita solo di Anuri, *Cylindrotaenia idahoensis* Waitz & Mehra, 1961,

* Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Via Accademia Albertina 13, 10123 Torino, Italia.

** Gruppo Speleologico Ligure/Genovese "Arturo Issel", Villa Comunale ex Borzino, 16012 Busalla (GE), Italia.

unica ad essere riportata solo in Pletodontidi, e *Nematotaenia minor* Ricci, 1988, sopra citata.

Nello studio di questi Cestodi sono emerse alcune difficoltà: 1) scarsità di materiale a disposizione (tutela del geotritone); 2) difficoltà tecniche di orientamento, distensione e preparazione dell'esemplare sul portaoggetto (vedi materiali e metodi); 3) aspetto delle proglottidi adulte larghe e cortissime, con organi piccoli; 4) descrizioni esistenti talvolta superficiali e troppo semplificate; 5) mancanza, sovente, delle proglottidi totalmente gravide, con difficoltà di seguire la formazione delle capsule paruterine.

Abbiamo rivolto una particolare attenzione agli organi paruterini, che paiono costituire un carattere essenziale nella diagnosi generica (posizione, struttura iniziale e terminale, numero e modalità di sviluppo), e all'aspetto dei gusci embrionali, particolare rispetto ai normali gusci dei Ciclofillidei, ai quali si aggiunge anche una capsula uterina. Infine è stata osservata ed esaminata, per via istochimica, la presenza di una struttura ghiandolare apicale dello scolice molto evidente che non sembra esser stata finora descritta, almeno nelle proporzioni da noi osservate. L'importanza degli organi apicali in tutti i cestodi è nota.

Quanto alla sistematica dei Nematotaeniidae ci siamo attenuti essenzialmente al lavoro di JONES (1987). La specie qui descritta appartiene certamente ad un genere diverso da *Nematotaenia*, unico diffuso in Europa ed assente in America (dopo la segnalazione dubitativa di SCHMIDT (1986), la sua presenza, citata da GOLDBERG & BURSEY (1991)⁽¹⁾ e GOLDBERG *et alii* (2002), andrà confermata con adeguata descrizione), mentre ha notevoli affinità morfologiche, oltre quella di possedere gli stessi ospiti (Plethodontidae), coi due generi americani *Cylindrotaenia* e *Distoichometra*. La nuova specie presenta caratteri intermedi tra i due generi ma è stata provvisoriamente attribuita a *Distoichometra* in attesa di nuove raccolte e di un confronto con materiale nordamericano.

¹ Nel testo di GOLDBERG sono citati von Linstow (1899), Walton (1939) e Kuntz (1940), che hanno segnalato la presenza di *N. dispar* in Nord-America. Questi dati attendono una verifica: all'epoca di Linstow l'unico genere conosciuto era *Nematotaenia*, e quanto agli altri due autori, si tratta di tesi o rendiconti di laboratorio di difficile consultazione e di cui non è possibile rintracciare il materiale.

Ciò conferma anche l'importanza del reperto da un punto di vista zoogeografico e della coevoluzione di certi parassiti e dei loro ospiti; in questo caso infatti siamo di fronte a Nematotaeniidae molto simili in Pletodontidi, paleartici e neartici, separati dall'Atlantico e tra l'altro di difficile dispersione.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati dieci esemplari di *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) della collezione Pastorino (etichettati inizialmente *Hydromantes italicus* Dunn), datati 1972 e provenienti da tre stazioni inedite, «Rifugio presso il Ponte di Rio dei Fontanini», «Rifugio Rio Noce», «Rifugio Nun-Serrè», rispettivamente di S. Bartolomeo di Savignone e di Isola del Cantone, in provincia di Genova; otto sono risultati parassitati. L'intestino, col suo contenuto, era stato fissato e conservato in formalina al 10%.

I cestodi successivamente estratti apparivano un po' macerati e contorti ma in discrete condizioni. Erano da uno a più esemplari per ospite; mancavano esemplari perfettamente maturi, con capsule paruterine a termine. Tutti gli esemplari sono stati colorati *in toto* con carminio cloridrico od emallume diluito, differenziati in alcool 70° acidulato (HCl) e montati in Balsamo del Canada. Di alcuni scolici sono stati confezionati preparati istologici con sezione 8-10 μ m per l'esame delle strutture ghiandolari apicali, risultate PAS-positive (reazione acido periodico-Schiff). Le osservazioni sono state eseguite con microscopio ad ottica interferenziale (Nomarsky) compresa l'immersione (x100). Nella descrizione per "proglottidi adulte" si intendono quelle con ovario maturo e passaggio delle uova nell'utero, sovente dette proglottidi mature.

La forma dei Nematotaeniidae non è piatta ben definita, tipica dei Cestodi, ma può essere quasi cilindrica. Ciò può causare nella preparazione una rotazione di tratti dello strobilo lungo l'asse longitudinale, sicché le proglottidi possono presentarsi all'osservatore o viste dorso-ventralmente (la norma) o di lato. Un punto di riferimento per capire la posizione della proglottide sotto osservazione è la tasca del cirro: se distesa attesta una visione frontale (=dorso-ventrale), mentre se appare in sezione traversa la visione è laterale.

RISULTATI

Distoichometra italica n. sp.

Holotypus: in *Speleomantes strinatii* (Aellen) di Liguria, Isola del Cantone (GE), Rifugio Rio Noce, 1972, leg. M. V. Pastorino, un es. montato su preparato microscopico (Muséum d'Histoire Naturelle, Genève, Svizzera)

Paratypus: stessi dati dell'holotypus, un es. montato su preparato microscopico (Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria", Genova).

D e s c r i z i o n e. Va premesso che, data l'anatomia estremamente semplice e uniforme, i caratteri significativi sono pochi, e purtroppo, tra questi, l'apparato copulatore (tasca del cirro e vagina) non ha potuto essere osservato con precisione. Ci siamo perciò concentrati su tre aspetti di interesse per l'identificazione sia generica sia specifica, di cui solo il primo era a tutt'oggi preso in considerazione. E precisamente: 1) complesso utero-organo paruterino indicato da JONES (1987) come "complesso paruterino" (morfologia, numero e posizione degli organi paruterini, trasformazioni durante lo sviluppo che coinvolge utero e organo paruterino); 2) organo ghiandolare apicale dello scolice; 3) formazione dei gusci embrionali, della capsula uterina e loro rapporti con l'organo paruterino.

Strobilo tendenzialmente cilindrico, lungo 12-18 mm a maturazione quasi completa. Pori irregolarmente alterni. Muscolatura longitudinale debole, di fasci sottili, netti e spaziati. Scolice largo 445-580 μm , inerme, munito di quattro robuste ventose rotondegianti (140-220 μm). Collo lungo e particolarmente largo nel tratto subito dopo lo scolice, diametro massimo 650 μm . Nella parte apicale dello scolice tutto lo spazio tra le ventose è occupato da un ammasso cellulare di natura ghiandolare costituito da cellule piriformi molto allungate, ricche di vacuoli chiari immersi in una sostanza PAS positiva, e disposte in file colonnari (fig. 1).

Proglottidi adulte presenti a circa 6-7 mm dall'estremità cefalica; estremamente corte e larghe (65-80 x 500-550 μm); quelle gravide quasi a termine (capsule paruterine non completamente formate) si allungano rispetto alle precedenti diventando poco più lunghe che larghe (275 x 220-250). Diametro dei canali escretori, dorsale: 2,5-3, ventrale: 8-10. I testicoli sono due, dorsali, e possono apparire

ovalari o sferici (55-61 x 80-100 μm). Il dotto di ogni testicolo converge nel dotto deferente che si dilata quasi subito formando una vescicola seminale esterna allungata, sovente ad ansa e abbastanza centrale, visibile chiaramente a partire dalle proglottidi semigravide; può raggiungere i 50-60 μm in lunghezza e permanere anche nelle proglottidi gravide. Questa vescicola non va confusa con un ricettacolo seminale come quello che persiste nelle proglottidi a maturazione avanzata in molti Ciclofillidei. Dalla vescicola esterna il dotto deferente raggiunge la tasca del cirro, con sinuosità più o meno accentuate. Penetrato nella tasca può aumentare leggermente di diametro diventando sinuoso ad anse strette, aspetto assimilabile a una vescicola seminale interna allungata, ripiegata su se stessa, delicata e senza forma definita, e non solo a un dotto eiaculatore, che è certamente molto corto data la piccolezza del cirro.

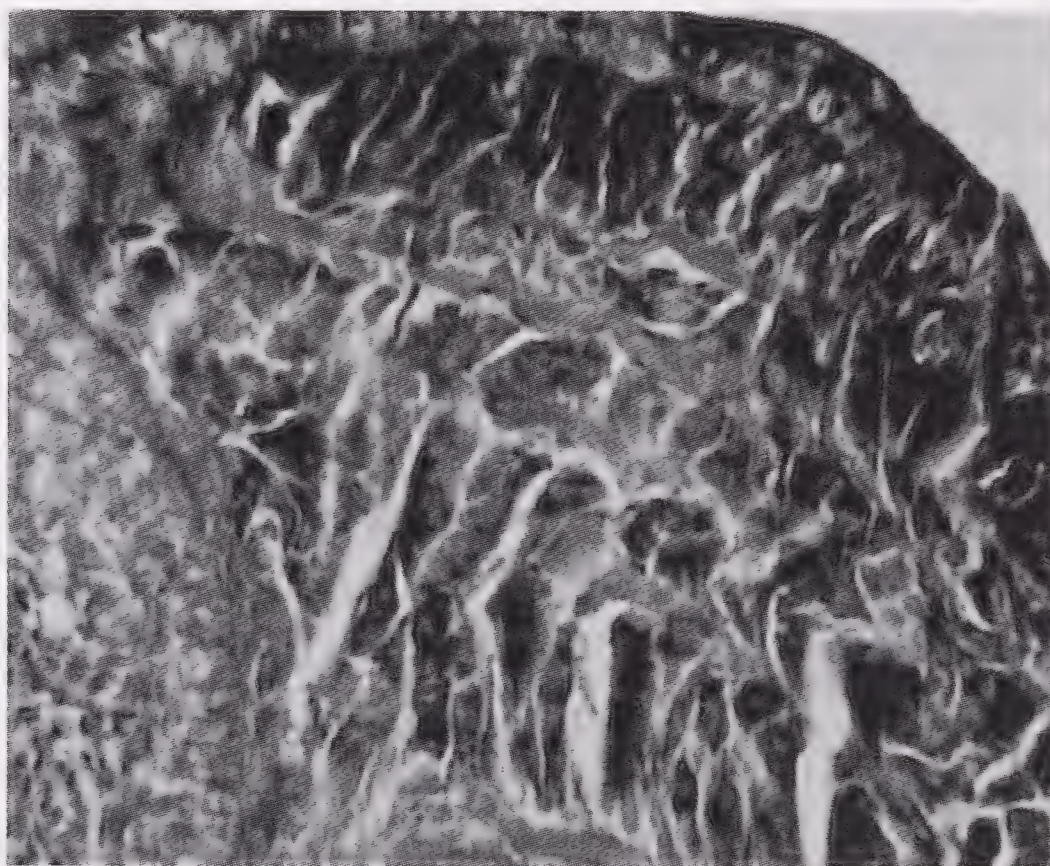


Fig. 1 - *Distoichometra italica* n. sp., sezione dell'apice dello scolice. In basso e a sinistra porzione di ventose; in alto a destra limite anteriore dello scolice; al centro masse scure di struttura ghiandolare Pas positiva.

La tasca del cirro è piccola, stretta, allungata, rastremata se vista trasversalmente, a parete relativamente sottile, e misura: 125-136 x 22-25 μm (quando stirata 170-175 x 18-20 μm); il cirro, molto piccolo, è di difficile osservazione e non sembra spinescente.

L'ovario è piccolo, leggermente ovale (39-42 x 25-33 μm), non lobulato, difficile da individuare, anche per le poche ovocellule, e

di rapida scomparsa; è ventrale e porale rispetto al vitellogeno. Il vitellogeno, in posizione più mediana rispetto all'ovario è anch'esso piccolo (30-35 μm), ma facilmente osservabile (nelle proglottidi adulte e prime gravide) per le sue cellule vitelline caratteristiche, compatte e rifrangenti. Non è stata osservata la ghiandola di Mehlis, che tra l'altro non è citata in nessuna descrizione di *Nematotaenidae*. Tuttavia nella parete del vitellodotto, prima di raggiungere l'ovidotto, sono state notate piccole cellule tondeggianti, trasparenti, che potrebbero avere una funzione vicariante. Il lungo tratto trasversale, leggermente sinuoso, che congiunge il punto d'incontro di ovidotto e vitellodotto con l'orifizio femminile è detto da JONES "canale copulatorio". In realtà questo dotto dovrebbe corrispondere, nella terminologia comune, alla "vagina"; una vagina estremamente lunga, leggermente ventrale rispetto alla tasca del cirro e al deferente. Questo "canale copulatorio" sembra sboccare nel piccolissimo atrio con un cono (36-52 μm), difficilmente visibile, con base rivolta verso il poro e strozzato prossimalmente da uno sfintere piccolissimo (il cono potrebbe anche rappresentare il fondo dell'atrio). Nelle proglottidi adulte o semi-gravide, subito dopo questa strozzatura, il dotto vaginale può dilatarsi formando una ampolla ovale (42-61 x 20-22 μm) abbastanza persistente. Questa ampolla sembra la vagina vera e propria, senza una parete con struttura differenziata, ma che si evidenzia dilatandosi dopo l'inseminazione. In questo caso la funzione di ricettacolo seminale verrebbe assunta dal lungo tubicino di diametro irregolare che segue in direzione prossimale. Qualora invece si volesse considerare come vagina solo lo sfintere e il piccolo cono terminale, allora l'ampolla citata corrisponderebbe ad un ricettacolo seminale in posizione terminale con lungo e stretto prolungamento prossimale. L'atrio forma un piccolissimo bulbo (28-30 μm di diametro) sovente indistinto (fig. 2).

L'utero si forma in posizione anteriore, con una massa estesa dorso-ventralmente (non trasversalmente) a contorno irregolare e cavità ingombra di ammassi cellulari connessi alla sua parete, che subito formano una capsula uterina attorno ad ogni uovo penetrato. Il tessuto paruterino (che sin dall'inizio, prima ancora di assumere la struttura di organo paruterino, si estende e aderisce sulla faccia anteriore dell'utero) dà origine ad alcuni organi paruterini digitiformi, non rigidi, che gradualmente si allungano rimanendo più o meno sinuosi e con leggere strozzature. La parete di questi sembra

in continuazione con lo strato più esterno della parete uterina. L'utero si divide in due masse, una dorsale e l'altra ventrale, per un certo tempo a contatto, ma che tendono a separarsi. Ciascuna è incappucciata da 2 a 4 organi paruterini (raramente 1 solo) che in totale ammontano a 4-6 (raramente 3 o 8). Gli organi paruterini

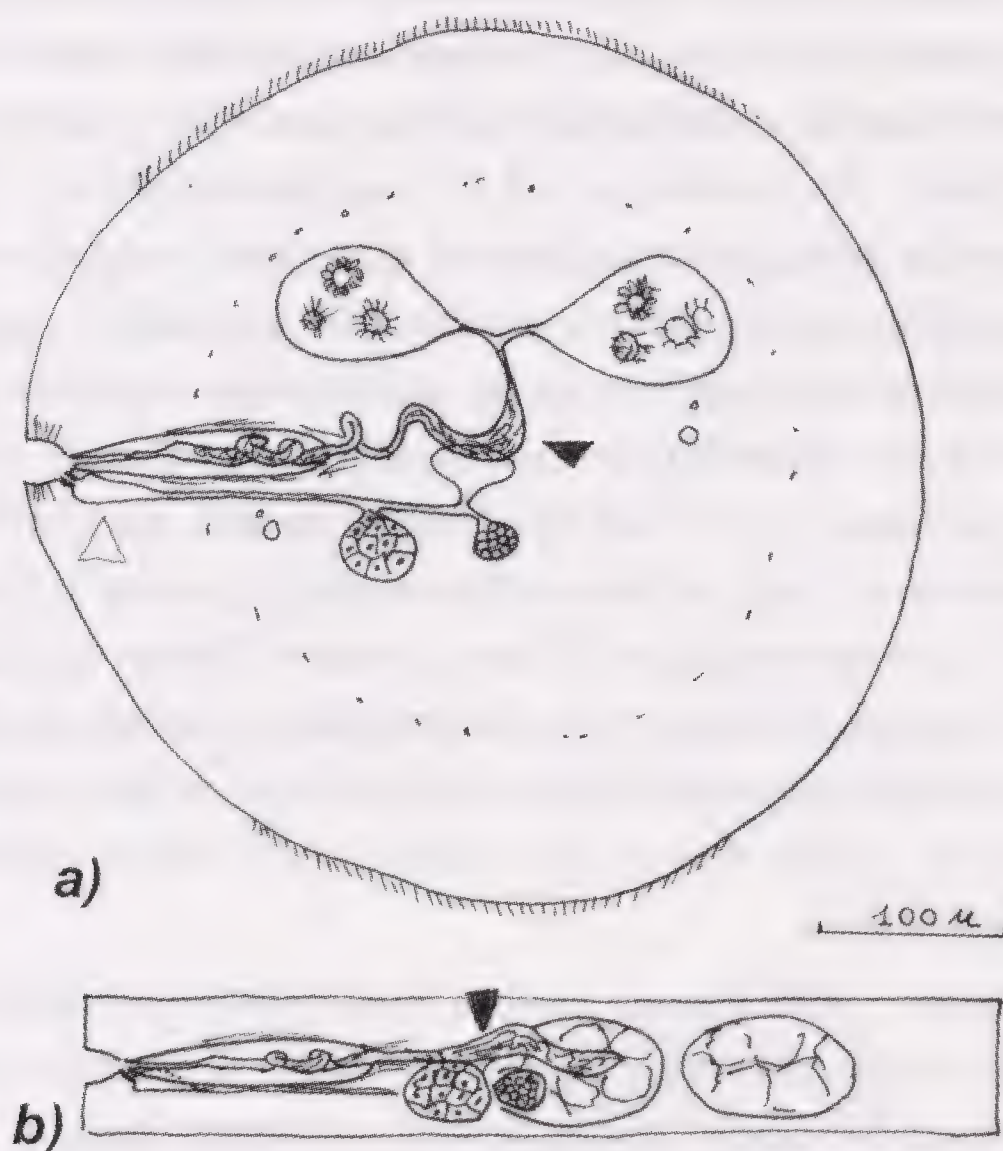


Fig. 2. - *Distoichometra italica* n. sp. Proglottidi adulte in sezione trasversale (a) e in visione dorso-ventrale (b). Freccia scura: vescicola seminale esterna; freccia chiara: dilatazione terminale vagina.

di ciascuna metà dell'utero sono diretti dorsalmente o ventralmente, secondo la massa uterina cui appartengono, e leggermente inclinati in avanti, soprattutto nelle proglottidi gravide. Si formano molto vicini, quasi uniti alla base, ma diventano via via più indipendenti. In ciascuna delle due parti dell'utero (dorsale e ventrale) si delimitano delle porzioni o sacche di embrioni destinate a ciascun organo paruterino, porzioni che rimangono a lungo a contatto tra loro e più facili da individuare quando inizia il trasferimento degli embrioni nell'organo paruterino. Questo abbinamento di un organo paruterino con la porzione di utero che gli compete è la vera unità funzionale

del complesso utero/organo paruterino, indipendentemente dal fatto che le singole porzioni di utero possano separarsi l'una dall'altra o rimanere a contatto. Inizialmente l'asse centrale dell'organo paruterino è cosparso di nuclei impilati, connessi ad espansioni lamellari trasversali, concave verso l'utero, che conferiscono all'organo paruterino un aspetto striato, caratteristico di molti Nematotaeniidae. Queste lamelle concave servono a risucchiare dall'utero, con l'ausilio di probabili movimenti peristaltici dell'organo paruterino, le "capsule uterine" contenenti l'oncosfera, ed a trascinarle verso l'apice, ove si formerà la capsula paruterina sferica, che, nel nostro caso, conterrà da 1 a 3-4 oncosfere. Quando si prepara il risucchio degli embrioni, nella parte prossimale degli organi paruterini (quella rivolta verso l'utero) aumenta la spaziatura tra alcune lamelle, e ciò determina la formazione di una o più cavità delicatissime che richiamano a sé le "uova", riteniamo con relativa "capsula uterina". Queste lamelle distendendosi e comprimendosi l'una contro l'altra sotto la pressione dell'embrione (o del gruppo di embrioni) penetrato, finiscono per formare la parte interna, diventata compatta, della parete della capsula paruterina la quale verrà poi anche rinforzata esternamente da cellule del parenchima.

La formazione dei gusci embrionali dell'oncosfera, così chiamati perché derivano dai blastomeri iniziali dell'embrione e non da cellule accessorie, avviene secondo lo schema tipico di numerose famiglie di Ciclofillidei e con qualche variazione rispetto ad altre. Il guscio più esterno possiede due grandi macromeri in posizione opposta (detta polare) attorno all'oncosfera, mentre quello interno è formato da tre cellule più piccole, mesomeri, situati all'incirca sotto i due macromeri, due da un lato, uno dall'altro. L'ampiezza e la forma del guscio esterno può variare molto secondo i generi e le specie; il guscio interno forma l'embrioforo, strato sclerificato ben riconoscibile e talvolta con struttura caratteristica, sovente accompagnato da uno o due strati amorfi che vi "aderiscono". Attorno al guscio esterno si trova una pellicola sottilissima aggiuntiva, difficilmente osservabile se non all'inizio dell'embriogenesi, prodotta dalla ghiandola di Mehlis ("coque" in francese, "capsule" in inglese, da non confondere con l'eventuale capsula uterina formata dall'utero).

In *D. italica* n. sp., nell'embrioforo che sembrerebbe rimanere sottile, inizialmente con ispessimenti irregolari, ci è parso rintrac-

ciare gli avanzi tipici dei mesomeri e segni del processo di sclerificazione che non sembra scostarsi dallo schema classico. Invece il guscio esterno, che non è una struttura rigida, risulta normale da una parte, con un grande macromero polare e una sottile pellicola che lo congiunge al macromero opposto, mentre dall'altra forma un particolarissimo ammasso di varie cellule, quasi grande come l'embrione. Contiene certamente un macromero cui sono addossate 3-5 cellule più piccole, di natura diversa. Una o due potrebbero essere mesomeri del guscio interno, le altre avanzi di globuli polari, ma la più strana e appariscente, formante una enorme vescicola, è di origine dubbia. Potrebbe essere lo stadio finale della cellula vitellina oppure anche un grande e costante vacuolo del macromero del guscio esterno di un solo polo. Il guscio risulta così profondamente asimmetrico (fig. 3). Da notare che, durante il passaggio dell'oncosfera attraverso l'organo paruterino per raggiungere la capsula paruterina, questo guscio esterno viene risucchiato per primo, formando una propaggine elastica assai sottile e lunga che precede l'oncosfera e probabilmente serve a richiamarla verso la capsula paruterina.

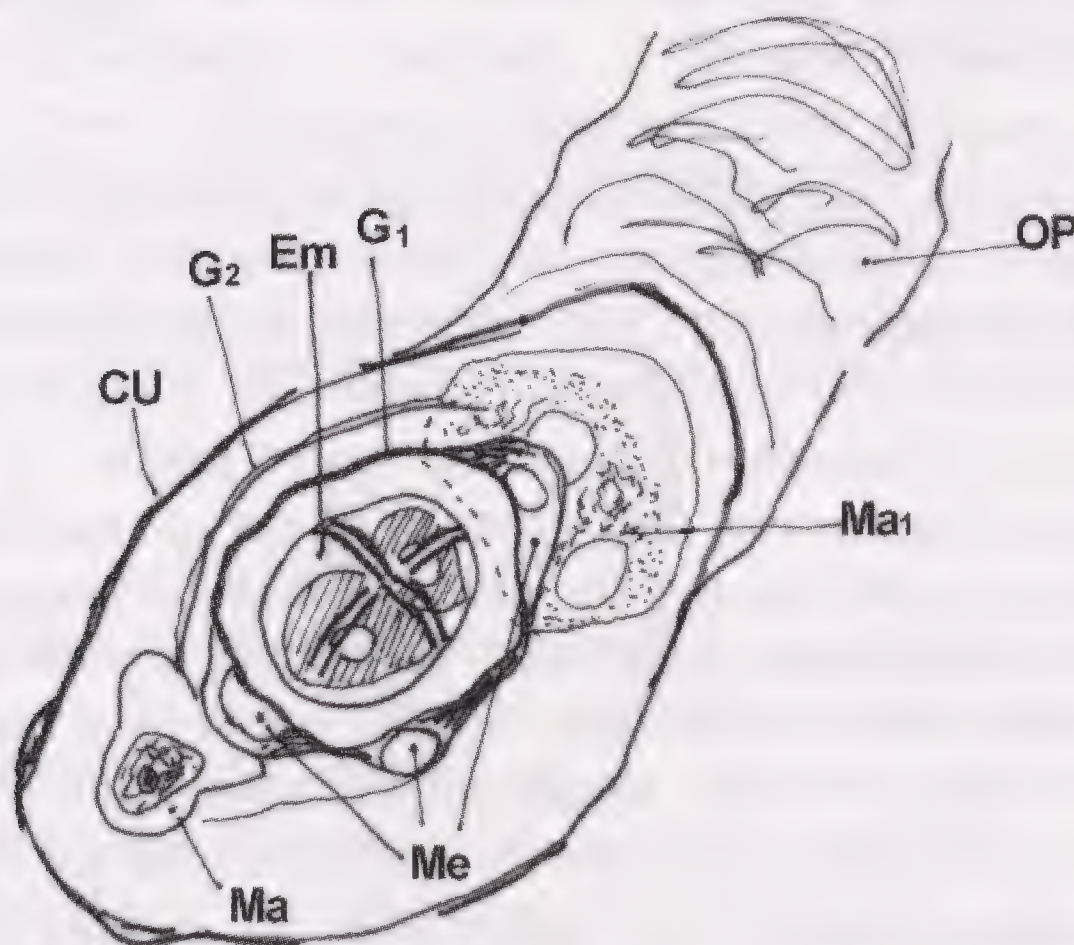


Fig. 3 - OP: organo paruterino; CU: capsula uterina; Em: embrione con 2 grosse cellule ghiandolari tipiche e uncini; G₁: guscio interno, futuro embriofo-ro; G₂: guscio esterno; Ma: macromero polare del guscio esterno; Ma₁: ammasso cellulare asimmetrico con macromero; Me: mesomeri del guscio interno (vedi anche fig.8).

D e r i v a t i o n o m i n i s. Il nome *italica* con cui segnaliamo la nuova specie riconduce al suo luogo di raccolta ed ha un preciso valore zoogeografico, essendo questa la prima specie di *Distoichometra* descritta per l'Europa.

DISCUSSIONE

Secondo JONES (1987) la famiglia dei Nematotaeniidae è costituita da 18 specie suddivise in quattro generi, con l'aggiunta di sette *species inquirendae*. Limitandoci alle prime, dodici sono presenti negli Anuri, di cui otto loro esclusive (in Bufonidae, Ranidae, Hylidae e Leptodactylidae, meno frequentemente in Rhacophoridae e Pelobatidae, e molto raramente in Microhylidae), e quattro comuni anche a Caudati e Rettili (!); le ultime sei, che non compaiono in Anuri, si trovano: cinque in Rettili ed una in Pletodontidi.

I Nematotaeniidae descritti in Pletodontidi sono pochi e comprendono solo generi del Nord-America (*Cylindrotaenia* e *Distoichometra*), dove peraltro sono localizzati la maggior parte degli ospiti. Unica eccezione è *Nematotaenia minor* Ricci, 1988, la sola specie segnalata e descritta in Pletodontidi dopo la revisione di JONES (1987), primo ritrovamento in Europa e prima segnalazione del genere *Nematotaenia* nei Geotritoni; comunque questa attribuzione generica è in attesa di conferma, anche se si può sin d'ora escludere l'appartenenza a *Cylindrotaenia* o *Distoichometra*. Tre dei quattro generi di Nematotaeniidae (*Cylindrotaenia*, *Distoichometra* e *Nematotaenia*) hanno almeno una specie parassita in Pletodontidi ed è in quest'ambito che dobbiamo inserire la nostra specie. Si può subito escludere l'appartenenza a *Cylindrotaenia*, per il numero dei suoi organi paruterini strettamente limitato a due, e a *Nematotaenia*, per il processo di formazione delle sue capsule paruterine che avviene dopo lo smembramento dell'utero, nonché per il loro numero usualmente molto maggiore e la posizione disordinata nel parenchima. Maggiori concordanze esistono per una attribuzione a *Distoichometra*.

Distoichometra Dickey, 1921 venne proposto per una nuova specie, *D. bufonis*, in *Bufo terrestris* negli U.S.A., che differiva dalle specie allora conosciute, *Nematotaenia dispar* (Goeze 1782) e *Cylindrotaenia americana* Jewell, 1916, nella disposizione e nel numero delle capsule paruterine (8-12). Due specie successivamente aggiunte al genere, e

precisamente: *D. kozloffii* Douglas, 1958, con 6 capsule paruterine, in *Hyla regilla* Baird & Girard, 1852 negli U.S.A., e *Baerietta enteraneides* (Helfer, 1948), pure con 6 capsule, in *Aneides lugubris* (Hallowell, 1849), sempre negli U.S.A., dopo un riesame del materiale vennero considerate da JONES (1987) come sinonimi di *D. bufonis*, sicché il genere è rimasto, a tutt'ora, monotipico. Del resto la validità di *enteraneides*, inizialmente descritta come *Proteocephalus* e, poi trasferita al genere *Baerietta* (con solo specie a 2 capsule, oggi ritenuto sinonimo di *Cylindrotaenia*) da YAMAGUTI (1959), era già stata messa in dubbio da WAITZ & MEHRA (1961) e SCHMIDT (1980). *D. bufonis* (fig. 4) rimane perciò l'unica specie cui confrontare *D. italica*.

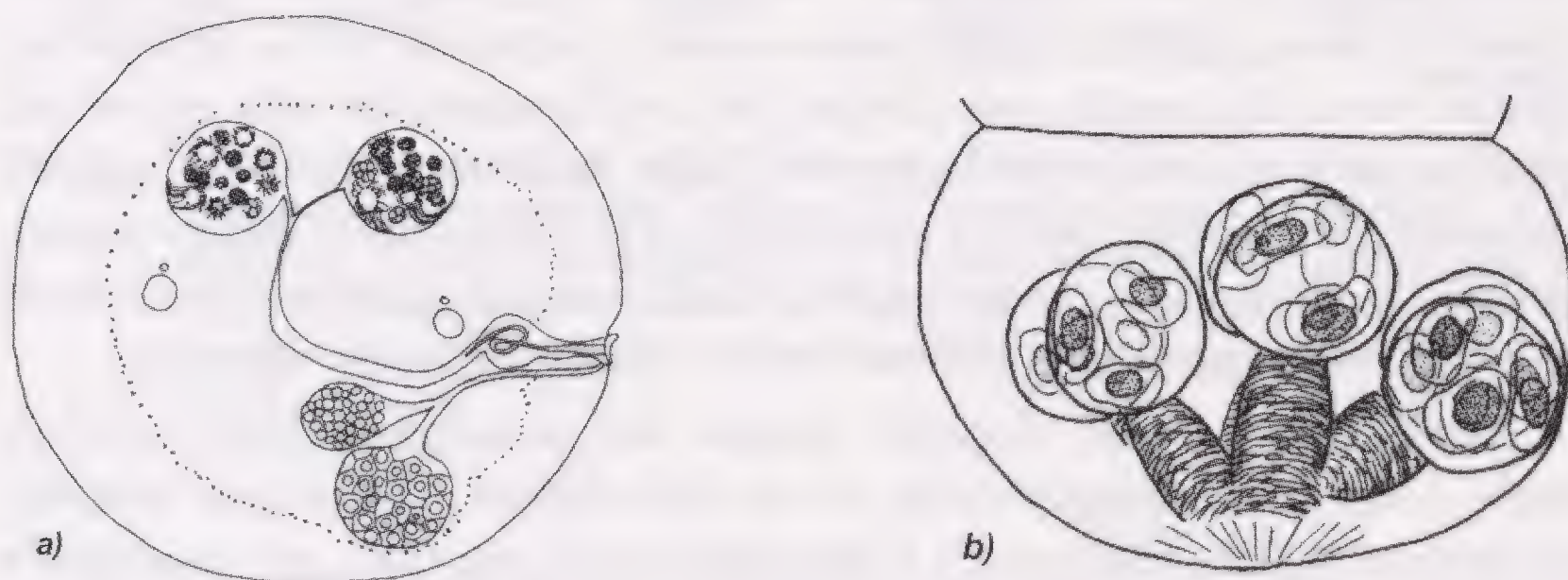


Fig. 4 - *Distoichometra kozloffii* Douglas, 1958 (oggi, secondo JONES, sinonimo di *Distoichometra bufonis* Dickey, 1921). Proglottide adulta in sezione trasversale (a); proglottide gravida con capsule paruterine formate in visione dorso-ventrale con due serie sovrapposte di capsule paruterine. Tratto da DOUGLAS, 1958. L'ingrandimento di questa figura è lo stesso della fig. 2.

Col termine “complesso paruterino” JONES (1987) intende tutto l'insieme formato da utero e organi paruterini, diverso da un genere all'altro e talvolta anche da una specie all'altra, includendo anche le trasformazioni che avvengono durante la maturazione nelle proglottidi semigravide e gravide, fino alla formazione definitiva delle capsule paruterine. Secondo questo schema, quando non c'è smembramento dell'utero l'insieme del complesso paruterino si mantiene in modo caratteristico per tutto il processo di maturazione. Questo aspetto, che si distingue da quello di *Nematotaenia* in cui ogni capsula paruterina finisce isolata nel parenchima, è stato confermato

da SWIDERSKI & TKACH (1997a). Comunque anche quando non esiste una frammentazione visibile dell'utero, si deve ammettere che all'interno dell'utero rimasto intero vengano delimitate delle sacche destinate al rifornimento di embrioni per ogni singolo organo paruterino. Con o senza separazioni, si formeranno delle "unità funzionali" indipendenti, costituite da un organo paruterino e da una porzione d'utero, che finiranno per trasformarsi in capsule paruterine: nella valutazione delle differenze converrebbe tener conto anche di queste.

E' opportuno puntualizzare due aspetti funzionali diversi nello sviluppo dell'organo paruterino. Nella fase iniziale l'organo paruterino appare come una appendice (anteriore in *Cylindrotaenia* e *Distoichometra*) di una porzione d'utero ancora piena di uova, appendice diretta verso la capsula paruterina che sta formandosi alla estremità opposta ed è ancora molto ridotta. Nella fase finale invece l'organo paruterino, o meglio quanto avanza dopo la formazione della capsula apicale, è diventato un'appendice della capsula paruterina, ormai piena d'uova, appendice diretta verso i resti dell'utero svuotato.

Sono due aspetti, iniziale (prima del passaggio delle uova) e finale (dopo il passaggio delle uova) dell'organo paruterino, talvolta abbastanza simili, ma inversi e che non vanno confusi, per una esatta interpretazione degli stadi del "complesso paruterino". L'aspetto trasversalmente striato dell'organo paruterino finale è da attribuire alla contrazione di fibre muscolari circolari che strozzano l'accesso alla capsula paruterina dopo il passaggio delle uova (fig. 3).

Il meccanismo del passaggio delle uova dall'utero alle capsule paruterine attraverso l'organo paruterino, secondo JONES, è ancora sconosciuto. Da quanto osservato, le uova di ogni porzione d'utero vengono "risucchiate" attraverso il corrispettivo organo paruterino, come si è detto, da movimenti peristaltici del medesimo e grazie alla sua struttura lamellare (vedi descrizione); dalla sua base raggiungono il suo apice dove è già iniziata la formazione della capsula.

Alcune osservazioni inedite su *N. minor* Ricci dimostrano che al criterio di discriminazione che si basa sullo sviluppo del complesso utero-paruterino (*sensu* JONES) e sulla modalità e tempi di distacco delle singole unità funzionali utero-paruterine, l'una dall'altra e dai residui dell'utero, bisognerà aggiungere l'aspetto puramente morfologico della struttura iniziale dell'organo paruterino e dei suoi

L'orientamento degli organi paruterini, carattere sovente utilizzato in *Cylindrotaenia*, è di dubbio utilizzo in *Distoichometra* per confronti con la letteratura (vedi ad esempio JONES, 1987, figg. 134-138 di pag. 233), non essendo chiaro lo stadio dell'organo paruterino considerato, se iniziale o finale.

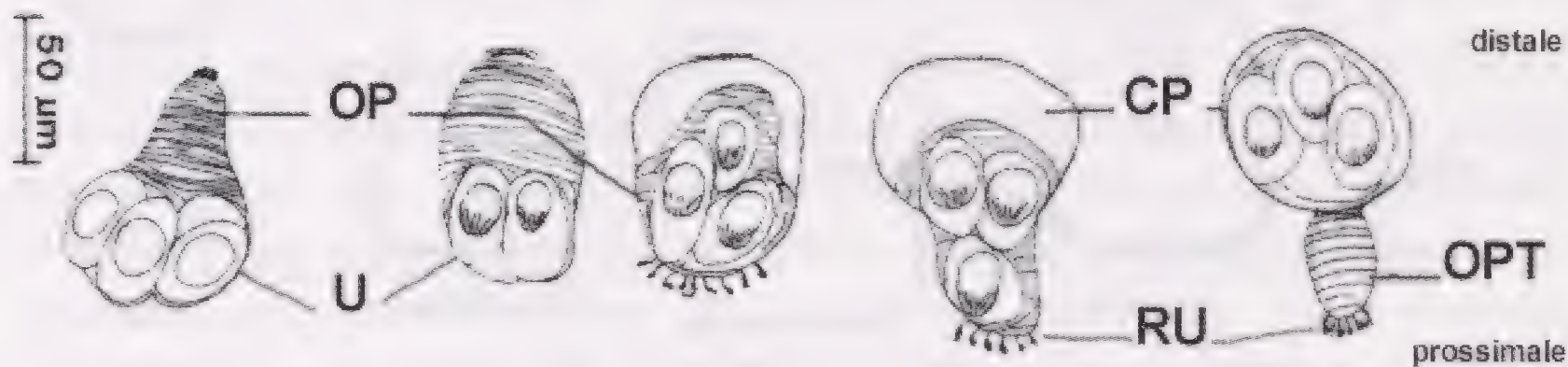


Fig. 5 - Fasi di sviluppo di una unità funzionale del complesso paruterino. Organo paruterino (OP), anteriore all'utero (U), prima e durante il passaggio degli embrioni; capsula paruterina (CP) con resti di organo paruterino (OPT) dopo il passaggio delle uova, e dell'utero (RU), posteriori alla capsula. In questo schema le capsule uterine non sono evidenziate. Figure tratte da JONES (1987).

In *Cylindrotaenia* ed in *D. bufonis*, così come in *italica*, il tessuto paruterino si sviluppa anteriormente all'utero, come sembra essere la norma; in tutte le specie di *Cylindrotaenia* si formano due organi paruterini (coppia) appaiati dorso-ventralmente che rimangono attaccati all'utero e l'ampiezza dell'angolo che li separa avrebbe valore specifico; in *D. bufonis* si formano da tre a sei organi paruterini in due file dorsale e ventrale sovrapposte (6-12 in tutto) e collegate ai resti di un utero che sembrerebbe rimasto intero; purtroppo non avendo osservato proglottidi gravide a termine in *italica*, non sappiamo se anche in questa specie, come in *bufonis*, le capsule paruterine rimangono collegate all'avanzo dell'utero.

Invece in *D. italica* l'utero si suddivide sin dall'inizio in due masse, una dorsale l'altra ventrale, prima connesse da un istmo ma poi indipendenti. Nella prima fase di sviluppo il complesso utero-organo paruterino ricorda il modello di *Cylindrotaenia* con la differenza che in *italica*, come si è detto, l'utero si suddivide in due masse separate, ciascuna con 2 a 4 organi paruterini, e perciò in totale da 4 a 8, contro i 6 a 12 in *bufonis* e solo 2 in *Cylindrotaenia*.

Quindi già solo lo sdoppiamento dell'utero e il numero di capsule paruterine sarebbero sufficienti per distinguere *italica* da *bufonis* (fig. 6). La sovrapposizione dei loro intervalli di variazione del numero

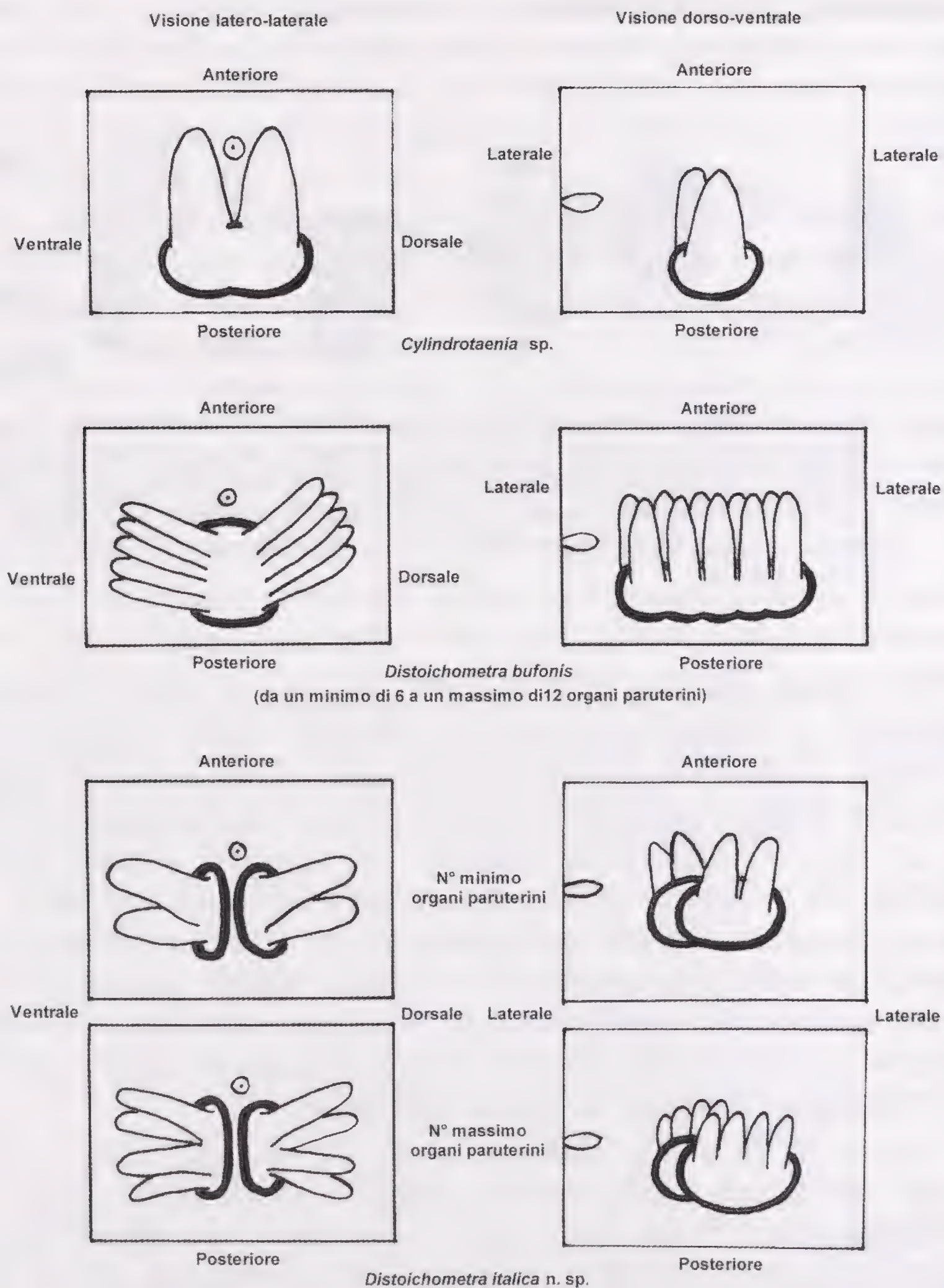


Fig. 6 - Schema del complesso utero-paruterino in *Cyliandrotaenia*, *Distoichometra bufonis* e *Distoichometra italica* n. sp. Utero: tratto spesso; organo paruterino: tratto sottile. All'apice degli organi paruterini si formerà la capsula paruterina, qui omessa.

di capsule paruterine, 4-8 *versus* 6-12, non pare tale da infirmare la differenza tra le due specie, convalidata anche da altri caratteri, come, in *italica*: la cospicua massa ghiandolare apicale dello sco-lice, la cui importanza sistematica andrà meglio valutata, avendone osservato tracce anche in altri Nematotaeniidae; la tasca del cirro più stretta, piccola e fusiforme, in cui il rapporto larghezza/lunghezza è di 1:6 contro 1:2 ed 1:3 (dai disegni di JONES 1987, in quanto i suoi dati numerici sono difficilmente confrontabili coi nostri); la vescicola seminale esterna, molto evidente a partire dalle proglottidi semigravide, non osservata in *bufonis*; una dilatazione vaginale distale pronunciata, con probabile piccolo sfintere pre-atriale, ove JONES (1987) indica per *bufonis* un semplice "canale copulatorio" uniforme (considerandolo addirittura tra i caratteri generici). Va comunque precisato che la vescicola seminale esterna e la dilatazione vaginale, che potrebbe vicariare un ricettacolo seminale in posizione anomala, si osservano solo in determinati momenti funzionali, il che rende necessario un controllo dei due caratteri in materiale certo di *bufonis*.



Fig. 7 - Distribuzione dei generi: *Nematotaenia* (tratto continuo) con all'interno *Distoichometra italica* n. sp. (area ovale nera), *Distoichometra bufonis* (tratteggio) e *Cyliandrotaenia* (punto e linea) con all'interno (punto pieno) la distribuzione per i Pletodontidi (da JONES, 1987, modificato).

D'altra parte anche la distribuzione geografica dei due reperti, Nord-America per *bufonis* ed Europa per *italica*, rendono verosimile una differenza tra le due specie (fig. 7).

Quanto ai gusci embrionali, escluso DOUGLAS (1961a), con le sue osservazioni istologiche su *Distoichometra kozloffii* Douglas, 1958 in Anuri nordamericani e su *Cylindrotaenia diana* (Helfer, 1948), in Pletodontidi pure nordamericani, nessuno ha descritto la particolare struttura del guscio esterno, con enorme cellula vescicolosa, da noi pure osservata (fig. 8). Neppure lavori recenti di ultramicroscopia, vedi JONES (1988) su *C. hickmani* Jones, 1985, SWIDERSKI & TKACH (1997b) su *Nematotaenia dispar* (Goeze, 1782) e CONN (1999) su *Distoichometra bufonis* Dickey, 1921, forniscono indicazioni in proposito. Il che significa o che questi autori non hanno preso in considerazione la suddetta struttura o che il loro materiale è ben diverso

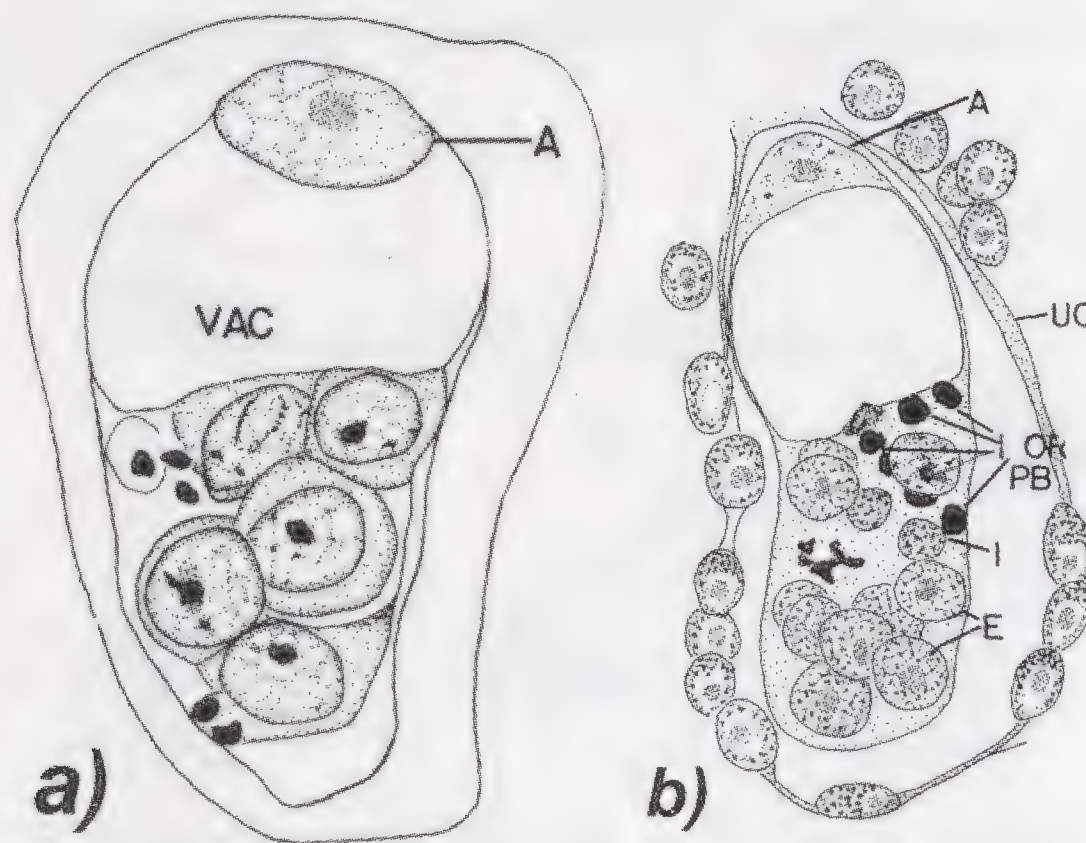


Fig. 8 - (a): *Cylindrotaenia diana* (Helfer, 1948) e (b): *Distoichometra kozloffii* Douglas, 1958. Embrioni, oncosfera ed annessi embrionali in fasi iniziali di sviluppo. Notare la particolare formazione vacuolare asimmetrica attribuita a macromero del guscio esterno da DOUGLAS (1961a), molto simile a quanto osservato in *Distoichometra italica* n. sp. Tratto da DOUGLAS, 1961a.

dal nostro. Questa caratteristica del guscio esterno potrebbe avere un significato sistematico interessante non essendo conosciuta, per quanto si sa, nei Ciclofillidei, e per il fatto che potrebbe essere limitata a una sola parte dei Nematotaeniidae.

La presenza e l'importanza sistematica di un ammasso ghiandolare apicale imponente andrà meglio valutata, avendone osservato tracce anche in altre specie di Nematotaeniidae.

CONCLUSIONI

I Cestodi dei geotritoni sono poco conosciuti in Europa e perciò sempre interessanti.

- 1) Il ritrovamento di *D. italica* in un geotritone dell'Appennino ligure allarga l'areale di diffusione dei Nematotaeniidae confermandoli, per ora, come unica famiglia di Cestodi conosciuta in questi Caudati.
- 2) In Europa l'unico genere conosciuto è *Nematotaenia*, negli Anuri e, dopo la descrizione di *N. minor* Ricci, 1988, anche nei Pletodontidi, mentre *italica* ha maggiori affinità con il genere nordamericano monotipico *Distoichometra* Dickey, 1921.
- 3) Con *italica* il genere *Distoichometra* si estende anche ai Pletodontidi europei, mentre i suoi ospiti tipici (ma non esclusivi, potendo trovarsi anche in Anuri) sono i Pletodontidi nordamericani.
- 4) *N. minor* e *D. italica* n. sp. non solo sono stati i primi ritrovamenti di un Nematotaeniidae in Pletodontidi europei, ma appartengono a generi diversi, il che fa pensare, contrariamente a quanto supposto, ad una maggiore diversificazione di questi Cestodi.
- 5) A parità di gruppo d'ospite ci sarebbe stata una differenziazione geografica nell'ambito delle specie di uno stesso genere parassita.
- 6) Un problema particolare, che esula dal presente lavoro, è sollevato da *Nematotaenia minor* Ricci, 1988, il cui modello di sviluppo del "complesso paruterino" è nettamente diverso da quello di *Distoichometra italica* n. sp., pur essendo stata trovata in Pletodontidi europei, e diverso anche da quello degli altri generi noti, compreso *Nematotaenia*.

BIBLIOGRAFIA

- CONN D.B., 1999 - Ultrastructure of the embryonic envelopes and associated maternal structure of *Distoichometra bufonis* (Platyminthes, Cestoidea: Nematotaeniidae) - *Acta Parasitol.*, Warszawa, 44: 4-10.
- DOUGLAS L.T., 1958 - The taxonomy of nematotaeniid cestodes - *J. Parasit.*, Lawrence, 44: 261-273.
- DOUGLAS L.T., 1961a - The development of organ system in nematotaeniid cestodes. I. Early histogenesis and formation of reproductive structures in *Baerietta diana* (Helfer, 1948) - *J. Parasit.*, Lawrence, 47: 669-680.
- DOUGLAS L.T., 1961b - The development of organ system in nematotaeniid cestodes. II. The histogenesis of paruterine organs in *Baerietta diana* - *J. Parasit.*, Lawrence, 47: 681-685.
- GOLDBERG S.R. & BURSEY C.R., 1991 - Helminths of three toads, *Bufo alvarrius*, *Bufo cognatus* (Bufonidae), and *Scaphiopus couchii* (Pelobatidae), from Southern Arizona - *J. helminth. Soc.*, Washington, 58 (1): 142-146.
- GOLDBERG S.R., BURSEY C.R., SALGADO-MALDONADO G., BÀEZ R. & CANEDA C., 2002 - Helminths parasites of six species of anurans from Los Tuxtlas and Catemaco Lake, Veracruz, Mexico - *Southwest. Natur.*, Durant, 47 (2): 223-229.
- JONES M.K., 1987 - A taxonomic revision of the Nematotaeniidae Lühe, 1910 (Cestoda: Cyclophyllidae) - *Syst. Parasit.*, Cordrecht, 10: 165-245.
- JONES M.K., 1988 - Formation of the paruterin capsules and embryonic envelopes in *Cylindrotaenia hickmani* (Jones, 1985) (Cestoda: Nematotaeniidae) - *Austr. J. Zool.*, Collingwood, 36: 545-563.
- RICCI M., 1988 - Parassiti del gen. *Speleomantes* (Amphibia Urodela: Plethodontidae) in Italia - *Riv. Parass.*, Roma, 48 (1) (1987): 5-25.
- SCHMIDT G.D., 1980 - *Baerietta allisonae* n. sp. (Cestoda: Nematotaeniidae) from a new Zealand gecko, *Hoplodactylus maculatus* - *N. Zeal. J. Zool.*, Wellington, 7: 7-9.
- SCHMIDT G.D., 1986 - CRC handbook of tapeworm identification - Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 675 pp.
- SWIDERSKI Z. & TKACH V., 1997a - Ultrastructure of the paruterine organs and paruterine capsules in the nematotaeniid cestode, *Nematotaenia dispar* (Goeze, 1782) Lühe, 1910, a parasite of Amphibians - *Intern. J. Parasit.*, Oxford, 27 (6): 635-644.
- SWIDERSKI Z. & TKACH V., 1997b - Differentiation and ultrastructure of onchosferal and uterin envelopes in the nematotaeniid cestode, *Nematotaenia dispar* (Goeze, 1782) - *Intern. J. Parasit.*, Oxford, 27 (9): 1065-1074.
- WAITZ J.A. & MEHRA K.N., 1961 - *Baerietta idahoensis* n. sp. A nematotaeniid cestode from the intestine of *Plethodon vandykai idahoensis* from northern Idaho - *J. Parasit.*, Lawrence, 47: 806-808.
- YAMAGUTI S., 1959 - *Systhema helminthum*. Volume 2: The cestodes of vertebrates - New York, Interscience Publishers, 860 pp.

RIASSUNTO

Distoichometra italica n. sp. si distingue dalle altre poche specie di Nematotaeniidae essenzialmente per sottili differenze dell'apparato utero-paruterino e per un voluminoso, caratteristico, organo ghiandolare apicale dello scolice. E' la prima specie di *Distoichometra*, genere prettamente nordamericano parassita di Anuri e Plethodontidi, descritta in Europa, dove era conosciuto soltanto il genere *Nematotaenia*.

Particolari interessanti sono: la suddivisione dell'utero in una massa dorsale e una ventrale; il numero totale degli organi paruterini, da 4-6(8); la struttura dei gusci embrionali dell'oncosfera, in cui quello esterno, con una enorme vescicola asimmetrica, conferisce all'uovo un aspetto unico tra i Ciclofillidei, confermando la descrizione di DOUGLAS (1961a) in *Distoichometra* e *Cylindrotaenia*.

ABSTRACT

Distoichometra italica n. sp. (Cestoda, Nematotaeniidae) parasite of European plethodontid *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) in Liguria.

Distoichometra italica n. sp. differs from the other few species of Nematotaeniidae in details of the uterus-paruterine organs and in a bulky, characteristic glandular structure on the scolex apical face. It is the first species of *Distoichometra* described for Europe, where only the genus *Nematotaenia* was known till now.

Interesting characters are: the subdivision of the uterus into a dorsal and a ventral mass; the total number of paruterine organs, varying from 4 to 6(8); the structure of the oncospherical envelopes, where the outer envelope, showing an enormous asymmetrical vesicle, assumes an aspect unique amongst the Cyclophyllidea, corresponding to DOUGLAS' (1961) description with reference to *Distoichometra* and *Cylindrotaenia*.

BIANCA MARIA UVA*, MADDALENA STURLA* &
MARIA ANGELA MASINI*

KIDNEY AND OSMOREGULATION IN
SPELEOMANTES GENEI (TEMMINCK & SCHLEGEL, 1838)
(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

Vertebrates that live in hypoosmotic environments maintain the equilibrium between extracellular and intracellular compartments excreting the excess of water and reabsorbing ions. Amphibians are the first Vertebrates that conquered with some success the dry land; some spend much of their life on the ground but return to water periodically to reproduce. Some salamanders have adopted a variety of adaptations to avoid the necessity of returning to water, but very few succeeded. Plethodontid salamanders like *Speleomantes genei* (Temminck & Schlegel, 1838), are among the few that were successful in laying their eggs on the ground of humid caves. They live in dark limestone caves where the temperature is fairly stable (LANZA 1946), they are lungless and possess an excellent olfactory apparatus that allows to catch preys in the darkness (UVA & DEPLANO 1983; UVA 1985). Ions reabsorption and water handling must therefore be a fundamental priority.

Aim of the present research was to investigate on the presence and localisation of ion transport and water channel proteins comparing in the kidneys tubules of *Speleomantes genei* the histological architecture with the immunohistochemical results.

Sodium ions, brought from the lumen into the cells via $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport proteins, are transported by the sodium pump in the extracellular compartment. Water may follow passively. Recently

* Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Viale Benedetto XV n. 5, 16132 Genova, Italia.

a family of water channel proteins, the aquaporins, that rules the transmembrane trafficking of water, was identified (AGRE *et alii* 1993). Calcium ions are also reabsorbed in the kidney tubules. The mitochondrial density was correlated to the presence of the osmoregulatory proteins in the cells of the tubules.

The investigation was carried out by histological techniques and immunohistochemistry using antibodies to $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport proteins, Na^+/K^+ ATPase and Ca^{2+} ATPase, the water channel protein AQP₃ and the antibody to the inner mitochondrial membrane (AMA).

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue preparation

Six specimens of *Speleomantes genei* were collected in Sardinian caves and housed in a tank with mud and sand. Within a few days the animals were killed by a blow to the head and spinal cord transection. The kidneys were immediately removed at 4°C, fixed in Bouin's fluid and then processed for embedding in paraffin wax.

Animal manipulation was performed according to the recommendations of the Ethical Committee and under the supervision of authorised investigators.

Histology

Bouin fixed sections (5µm thick) were stained with the haematoxylin-eosin technique.

Immunohistochemistry

Sections (5µm thick) from Bouin-fixed samples were subjected to the indirect immunofluorescence technique (COONS *et alii* 1955). Sections were dewaxed and after exposure in a moist chamber to Normal Goat Serum (diluted 1:50; Dako, Santa Barbara, CA) at 20°C, the unwashed sections were incubated overnight at 4°C with the following antisera: Ab-AMA (Antibody to Mitochondrial Antigen) raised in rabbit (diluted 1:20; Medic, Pavone Canavese, Italy), anti-water channel aquaporin 3 (AQP3) raised in rabbit (diluted 1:300;

Sigma-Aldrich, Milano, Italy), Ab- Na^+K^+ -ATPase, subunit, Ab to Ca^{2+} ATPase, and Ab- $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (T_4 NKCC1) cotransporter raised in mouse (these antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank-Department of Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA). After washing in phosphate buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.4), a second layer of fluoresceine-isothiocyanate conjugated -globulins, swine anti-rabbit (diluted 1:20, Dako) for the Ab-AMA, Ab-AQP3, and goat anti-mouse (diluted 1:100, Sigma-Aldrich) for the Ab- Na^+K^+ -ATPase, Ca^{2+} ATPase and $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporters treated sections, was applied for 30 min in a moist chamber, at 20°C. Sections were rinsed in PBS, mounted with glycerol-PBS (1:9) and examined under an Olympus epifluorescence microscope. The specificity of the immunostaining was verified by omitting one of the steps of the immunohistochemical procedure, or by replacing the primary antiserum with non-immune serum or PBS.

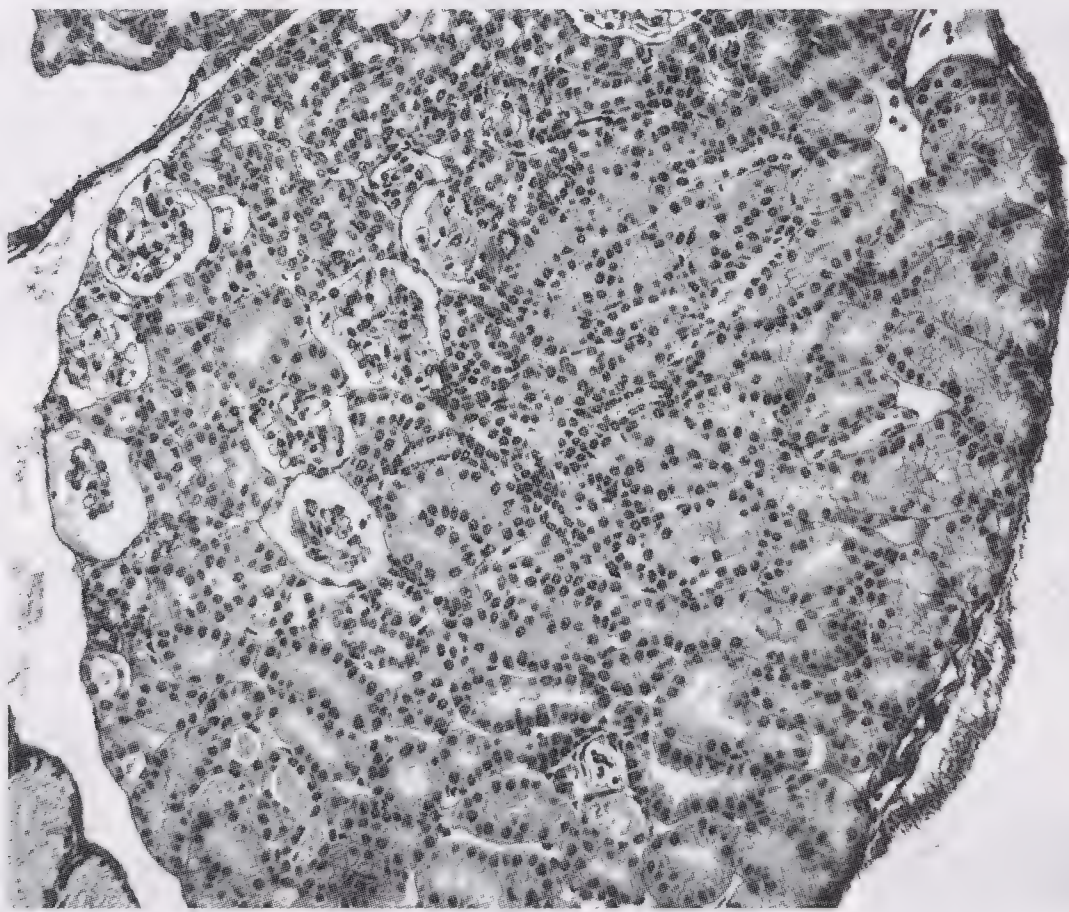


Fig. 1 - Photomicrograph of a transverse section of *Speleomantes genei* kidney to show the general arrangement of the tissue. Haematoxylin-eosin x 40.

RESULTS

Histology

The renal tubule consists of a big corpuscle, a long proximal segment, a distal segment and a collecting duct; two narrow ciliated

segments connect the glomerular capsule with the proximal segment and the latter with the distal segment (fig. 1 and fig. 2). The long proximal segment consists of high cells with basal nucleus, a brush border and vesicles in the apical region, protruding toward the lumen, in which large quantities of materials are secreted (fig. 2 A). The distal segment consists of moderately high cells with no brush border in the apical region (fig. 2 B). The collecting duct consists of low cuboidal cells, deprived of brush border and with very few membrane infoldings at the basal side (fig. 2 C).

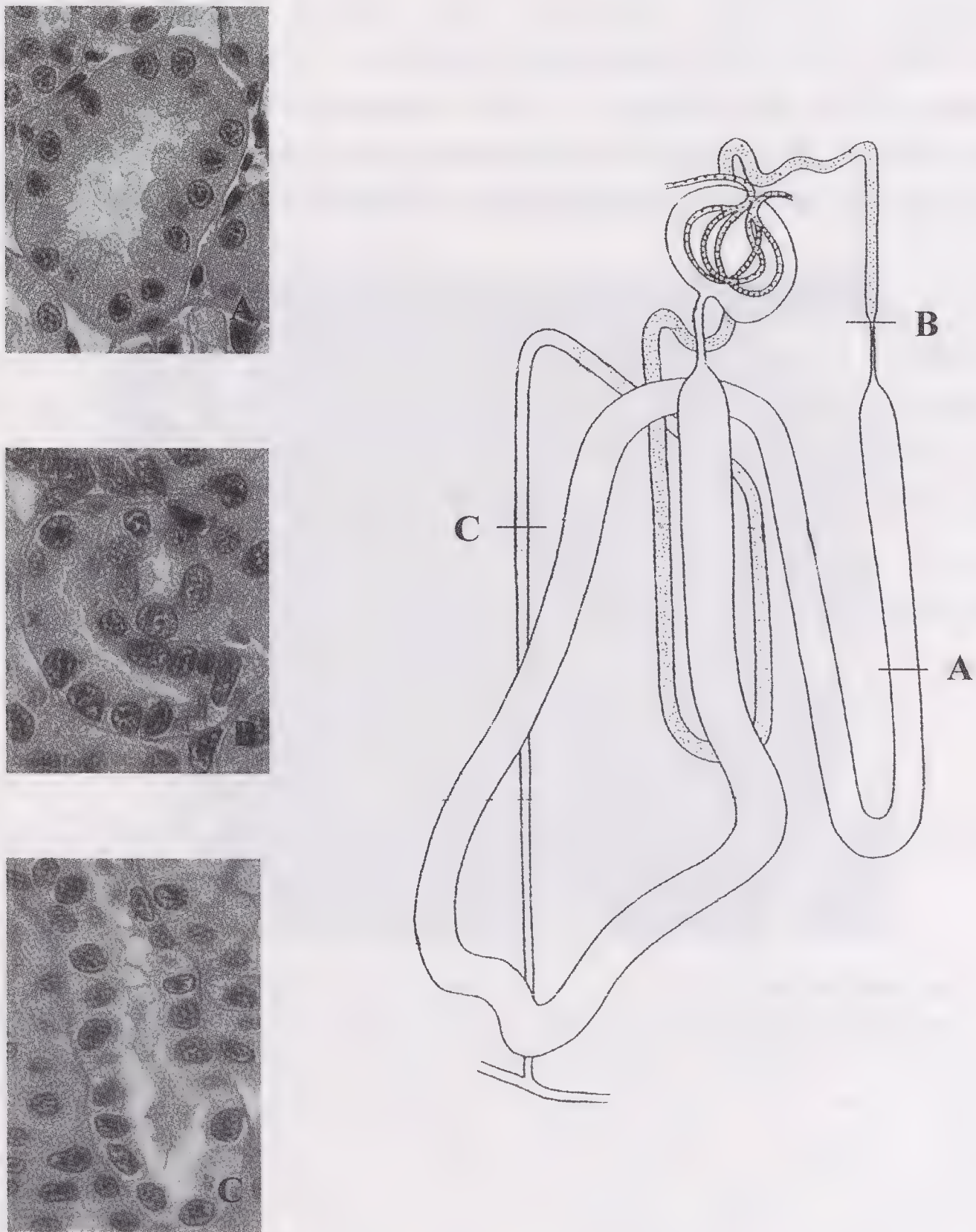


Fig. 2 - Diagrammatic reconstruction of a renal tubule. (A) section of the proximal region showing apical vesicles and material into the lumen. (B) section of the distal segment with basal nucleus and clear apical cytoplasm. (C) section of the collecting duct with low cuboidal cells. A,B,C x 100.

Immunohistochemistry

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter. Immunoreactivity for the cotransport proteins was distributed in the cytoplasm of the cells in the proximal and distal segments. In the collecting duct the positivity was mainly localised at the apical region of the cells (fig. 3 a).

$\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$. Immunoreactivity for the sodium pump was limited to the distal segments, at the basal-lateral side of the cells (fig. 3 b).

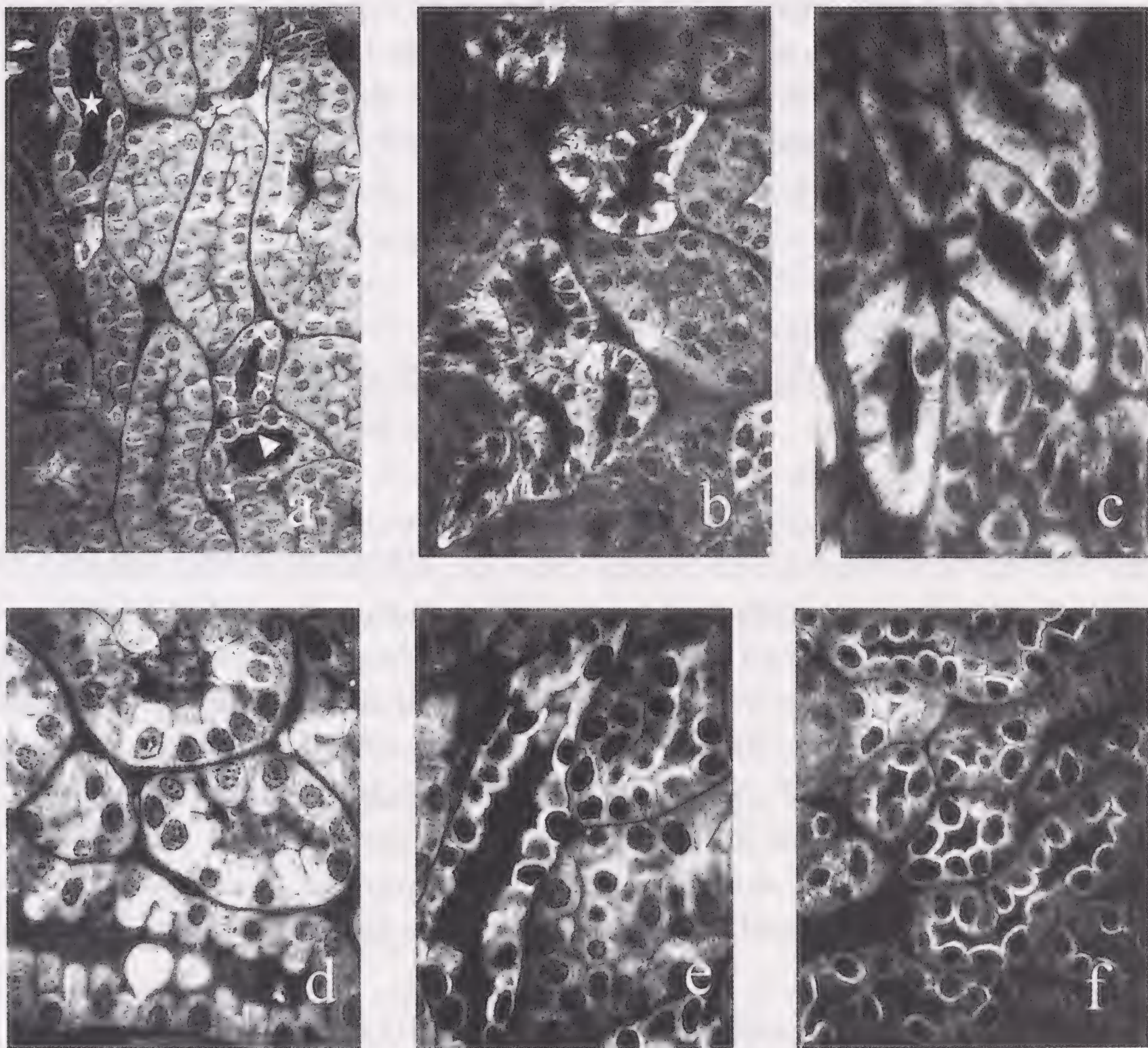


Fig. 3 - (a) Immunoreactivity for the cotransport proteins in the proximal and distal segments (arrow and arrowhead respectively) and in the collecting ducts (star). (b) Immunoreactivity for $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATPase}$ in the distal segments located at the baso-lateral sides of the cells. (c) Immunoreactivity for $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ distributed in all the cytoplasm of the cells in the distal segments. (d) Immunoreactivity for AQP_3 in the cells of the proximal segment and (e) in the cells of the collecting ducts. (f) Immunostaining for AMA located at the luminal side of the cells in the collecting ducts. a x50; b x70; c, d, e, f x100.

Ca²⁺ATPase. The immunostaining was localised in the cytoplasm of the distal segment's cells (fig. 3 c)

Aquaporins. The reaction was distributed throughout the cytoplasm in the cells of the proximal tubules and limited to the luminal side of the cells in the collecting ducts, where the immunoreactivity was very strong. In the proximal tubule AQP3 is also located in intracellular vesicles protruding into the lumen of the plasma membrane (figs. 3 d, e).

Mitochondria. Immunostaining for AMA (proteins of the inner mitochondrial membrane) was localised in the cells of the proximal tubules, gathered around the nucleus, in the distal segment, located in the basal part of the cells, and in the collecting ducts where mitochondria were concentrated at the luminal side (fig. 3 f).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The architecture of the kidney in diverse species of Amphibians shows no difference: the nephrons consists of the same segments and the shape of the cells, in each segment, are very similar. In consequence, the maintenance of the ion-water equilibrium in the diverse environmental conditions must be allocated in the osmoregulatory mechanisms, present in the different regions of the nephron. Na⁺/K⁺ATPase and Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporters are the major proteins involved in ion transport across the kidney tubules. Na⁺/K⁺ATPase is, in most eukaryotic cells, the enzymatic activity responsible for the active transport of Na⁺. The enzyme has been shown to consist of two subunits α and β . The α subunit is the catalytic part of the Na⁺/K⁺ exchange and shows a highly conserved aminoacid sequence in diverse vertebrate and invertebrate species (KAWAKAMI *et al.* 1985; SHULL *et alii* 1985).

The family of Aquaporins (AQPs) consists of ten proteins cloned from lower organisms, like yeast, to mammals (for a review see AGRE 2000; VERKMAN & MITRA 2000). Two aquaporins subgroups appear to be present: AQPs that are selectively permeable to water (AQPs 1,2,4,5,6,8) and aquaglyceroporins (AQPs 3,7) that are permeable both to water and glycerol (VERKMAN & MITRA 2000). Functional expression of aquaporin 3 in *Xenopus* oocytes confirmed its predominant water-channel function in Amphibians. AQP3 mRNA was

mainly expressed in rat kidney in the cells of the collecting duct (ISHIBASHI *et alii* 1994).

In *Speleomantes*, immunoreactivity for the cotransporter NKCC1 T₄, was limited to the distal segment and the collecting duct, segments involved in ion and water reabsorption. The monoclonal antibody to the Na⁺/K⁺ATPase, IGg α5, recognised its epitope in the cells of the distal segment. Immunoreactivity for AQP3 was very strong and distributed in the proximal and distal segments. The presence in the proximal segments' cells of AQP3-filled vesicles protruding into the lumen may indicate a fusion by exocytosis with the plasma membrane, thus inserting AQP3 into the membrane. This process was described for AQP2 in mammalian renal cells (BROWN *et alii* 1998).

It may be concluded that *Speleomantes*, that spends its life on land, reabsorbs from the preurine, by means of the collecting ducts cells, water and, moderately, ions from the proximal and distal segments. A similar function is seen in the segments of the kidney of some Birds and in Mammals.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the University of Genoa, Italy. The antibody developed by Fambrough D.M. was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242.

REFERENCES

- AGRE P., 2000 - Aquaporin water channels in kidney - *J. Am. Soc. Nephrol.*, Philadelphia, 11: 764-777.
- AGRE P., PRESTON G.M., SMITH B.I., JUNG J.S., RAINA S., MOON C., GUGGINO W.B. & NIELSEN S., 1993 - Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel - *Am. J. Physiol. Renal*, Bethesda, 265: F463-F476.
- BROWN D., KATSURA T. & GUSTAVSON C.E., 1998 - Cellular mechanisms of aquaporin trafficking - *Am. J. Physiol. Renal*, Bethesda, 275: F328-F331.
- COONS A.H., LEDUC E.H. & CONNOLLY J.M., 1955 - Studies on antibody. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit - *J. exper. Med.*, New York, 102: 49-59.

- ISHIBASHI K., SASAKI S., FUSHIMI K., UCHIDA S., KUWAHARA M., SAITO H., FURUKAWA I., NAJIMA K., YAMAGUCHI Y., GOJOBORI T. & MARUMO F., 1994 - Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells - *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 91: 6269-6273.
- KAWAKAMI K.S., NOGUCHI M., TAKAHASCHI H., OHTA T., KAWAMURA M., NOJIMA H., NAGANO K., HIROSE T., INAYAMA S., HAYASHIDA H., MIYATA T. & NUMA S., 1985 - Primary structure of the α -subunits of *Torpedo californica* (Na^+/K^+): ATPase deduced from cDNA sequence - *Nature*, London, 316: 733-736.
- LANZA B., 1946 - L'*Hydromantes* Gistel in Toscana e notizie sui suoi costumi - *Arch. zool. ital.*, Torino, 31: 219-237.
- SHULL G.E., SCHWAT A. & LLINGREL J.B., 1985 - Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the Na^+/K^+ -ATPase deduced from a complementary DNA - *Nature*, London, 316: 691-695.
- UVA B.M., 1985 - Olfaction, related structures and functional adaptations - *Boll. Zool.*, Modena, 52: 331-337.
- UVA B.M. & DEPLANO S., 1983 - Olfactory structures in *Hydromantes italicus*: a morphological basis for a particular prey catching behaviour - *Boll. Zool.*, Modena, 50: 57-62.
- VERKMAN A.S. & MITRA A.K., 2000 - Structure and function of aquaporin water channels - *Am. J. Physiol. Renal*, Bethesda, 278: F13-F28.

ABSTRACT

Speleomantes genei spends its life in humid habitats and completely avoids water even during reproduction, its control of ion-water balance must therefore be a fundamental priority. In Amphibians the kidney is one of the organs involved in the loss of water, being non-mammalian vertebrates unable to produce hyperosmotic urine. To reduce water and ion loss the cells in the renal tubules must possess well-developed osmoregulatory machinery.

Sodium ions, brought into the cells via $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport proteins, are extruded by the sodium pump Na^+/K^+ ATPase in the extracellular compartments. The water channel proteins, aquaporins, rule the transmembrane trafficking of water. Ca^{2+} ATPase control the reabsorption of calcium ions. The presence of ion cotransport proteins, sodium pump, Ca^{2+} ATPase and aquaporins were investigated in the different regions of the renal tubule. The mitochondrial density was correlated to the presence of the osmoregulatory proteins.

The investigation was carried out by histological staining to identify the segments of the nephron and by immunohistochemistry using antibodies to $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport proteins NKCC1 T_4 , to Na^+/K^+ ATPase, to Ca^{2+} ATPase, to the water channel aquaporin 3 and to proteins of the inner mitochondrial membrane AMA.

The results indicate that ion reabsorption occurs in the distal and collecting ducts, while water channels are located in the proximal segment and in the collecting duct of the nephron.

In *Speleomantes* therefore different segments of the renal tubule are specialised to perform diverse functions, all of which are cooperating to the maintenance of ion-water balance.

RIASSUNTO

Rene ed osmoregolazione in *Speleomantes genei* (Temminck & Schlegel, 1838) (Amphibia, Plethodontidae).

Speleomantes genei trascorre la sua vita in ambienti umidi completamente svincolato dall'ambiente acquatico anche durante la riproduzione. La difesa del patrimonio idrico-salino deve quindi necessariamente essere un problema prioritario. Il rene è tra gli organi più coinvolti nella perdita d'acqua poiché i Vertebrati non mammiferi producono un'urina ipoosmotica rispetto al plasma. Per ridurre la perdita d'acqua e di ioni le cellule del tubulo renale devono possedere un ben sviluppato sistema osmoregolativo. L'ultrafiltrazione glomerulare lascia passare gli ioni nella preurina, proteine cotrasportatrici, quali la $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter, trasferiscono gli ioni sodio dal lume all'interno delle cellule del tubulo renale. La pompa sodica $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$ estrude gli ioni sodio nel comparto extracellulare. Le aquaporine, canali per l'acqua, regolano il trasporto delle molecole d'acqua attraverso le membrane plasmatiche. La $\text{Ca}^{2+}\text{ATPasi}$ controlla il riassorbimento degli ioni calcio.

In questa ricerca la presenza delle proteine cotrasportatrici, della pompa sodica, della $\text{Ca}^{2+}\text{ATPasi}$, e dell'aquaporina è stata studiata nelle differenti regioni del tubulo renale. La densità mitocondriale è stata correlata alla presenza delle proteine coinvolte nell'osmoregolazione. La ricerca è stata condotta con colorazioni istologiche per identificare i differenti segmenti del tubulo renale e con metodiche d'immunistoichimica utilizzando anticorpi contro la proteina cotrasportatrice $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ NKCC1 T4, gli enzimi $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{ATPasi}$, la proteina aquaporina 3 ed anticorpi contro proteine della membrana mitocondriale interna AMA. I risultati indicano che il riassorbimento attivo degli ioni avviene nel segmento distale e nel dotto collettore, mentre i canali per l'acqua sono localizzati nel segmento prossimale e nel dotto collettore. In *Speleomantes* quindi i diversi segmenti del tubulo renale sono specializzati per eseguire funzioni differenti, tutte però coordinate al mantenimento dell'equilibrio idrico-salino.

RES LIGUSTICAE CCXLVIII

ROBERTA CIMMARUTA*, GIANLUCA FORTI**,
BENEDETTO LANZA *** & GIUSEPPE NASCETTI*

THE EFFECTS OF QUATERNARY GLACIATIONS ON
THE GENETIC STRUCTURE OF *SPELEOMANTES*
STRINATII (AELLEN, 1958)

(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

The alternation of cold and warm stages of glacial and interglacial periods during the Pleistocene had a strong impact on the distribution and evolution of vegetation and associated faunal species (COMES & KADEREIT 1998; HEWITT 2000). One of the animal genera strongly influenced by the succession of glacial and interglacial stages has been the plethodontid salamander *Speleomantes*, due to its particular biological features. Indeed these salamanders usually hatch completely metamorphosed from eggs, lack an aquatic larval stage, are lungless with cutaneous and bucco-pharyngeal respiration and are strongly associated with underground retreats, offering a steady cold and moist environment (SALVIDIO *et alii* 1994; CIMMARUTA *et alii* 1999; LANZA 1999). These features, coupled with low vagility and restricted home ranges, make *Speleomantes*' geographic distribution strongly affected by climatic variations.

In particular, the species *Speleomantes strinatii* has a relatively wide range, compared with those of the congeneric species, comprising north-western Italy and south-eastern France. In these zones

* Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università della Tuscia, Via S. Giovanni Decollato 1, 01100 Viterbo, Italia;
e-mail: cimmaruta@unitus.it & nascetti@unitus.it

** Museo del Fiore, Piazza G. Fabrizio 17, 01021 Acquapendente (VT), Italia;
e-mail: museo.fiore@tin.it

*** Dipartimento di Biologia Animale e Genetica & Museo di Storia Naturale (Sezione Zoologia "La Specola"), Università degli Studi di Firenze, Via Romana 17, 50125 Firenze, Italia; e-mail: benedetto.lanza@tin.it

the climatic variations of the Quaternary had great influence on the evolutionary history of local populations because of the uneven local orography. The genetic diversity of this species, investigated by means of allozyme electrophoresis, has been correlated with the paleoclimatic events of the species range, to understand the microevolutionary mechanisms leading to its extant genetic structure. A number of subspecies has been described on morphological basis within this species (see LANZA *et alii* 1995: p.53) but their validity has been recently challenged based on genetic ground (NASCETTI *et alii* 1996). The data obtained here on the genetic-geographic structure of *S. strinatii* have been used to reanalyse the systematics of these questioned taxa.

MATERIALS AND METHODS

About 400 specimens of *S. strinatii*, collected from 29 populations scattered through the whole range of the species have been studied (Tab. 1).

The techniques used for multilocus electrophoresis are those reported in LANZA *et alii* (2005) and are described in detail in LANZA *et alii* (1995). Following these procedures with minor modifications, the following 33 putative loci have been scored: α -Gpdh, Ldh-1, Ldh-2, Hbdh, Mdh-1, Mdh-2, Mdhp-1, Mdhp-2, Idh-1, Idh-2, 6-Pgdh, Gapdh, NADH-dh, Sod-1, Sod-2, Np, Aat-1, Aat-2, Ck, Adk, Est-4, Pep-C, Ped-D, Lap, Ada-1, Ada-2, Ca-2, Ca-3, Fum, Mpi, Gpi, Pgm-1, Pgm-2. They included about one third of fast and two thirds of slow evolving loci, *sensu* SARICH (1977) and KOEHN & EANES (1978).

The genetic variability of populations was evaluated using the following parameters: overall number of alleles per population (A); percentage of polymorphic loci (P) following 99% (P_{99}) and 95% (P_{95}) criteria and mean expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosity per population. The statistical significance of departures from the Hardy-Weinberg equilibrium was estimated using χ^2 test.

Genetic distances (D_{Nei} and D_{Rogers}) have been calculated according to both NEI's (1972) and Rogers' (WRIGHT 1978) methods. Calculations were performed using BIOSYS-1 computer program (SWOFFORD & SELANDER 1989). Times of evolutionary divergence

(t) were calculated using the formula proposed by NEI (1975) when $D_{Nei} < 1$: $t = 5 \cdot 10^6 \cdot D_{Nei}$.

A principal component analysis (PCA) was carried out using SYSTAT 5.2 (WILKINSON *et alii* 1992). The PCA was based on a matrix of the allele frequencies of polymorphic loci, after removing alleles with frequencies lower than 10%.

Table 1 - Code number of *Speleomantes strinatii* samples listed with the collecting sites and their province and region.

Number	Collecting sites	Province	Region/Country
1	Pietra di Vasca Mt.	Genoa	Liguria
2	Eastern Slope of Groppi Mt.	Genoa	Liguria
3	Environs of Carro and Ponte S. Margherita	La Spezia	Liguria
4	Pù Mt., in the Rio Frascaresse Valley	Genoa	Liguria
5	Near Cassagna	Genoa	Liguria
6	Cave "Tana de Strie"	La Spezia	Liguria
7	Cave "Tana da Cruxetta"	La Spezia	Liguria
8	Near Maissana and SW slope of Baralucco Mt.	La Spezia	Liguria
9	Near Codolo	Massa Carrara	Tuscany
10	Near Bardi	Parma	Emilia Romagna
11	Near S. Pietro di Novella and Rapallo	Genoa	Liguria
12	Near Scaglia, Bargagli	Genoa	Liguria
13	Near Cartasegna	Alessandria	Piemonte
14	Near Isoverde	Genoa	Liguria
15	Near Millesimo	Savona	Liguria
16	Near Roveirola, N slope of Bric Cornavento	Savona	Liguria
17	Near Finale Ligure	Savona	Liguria
18	Near Gavone	Savona	Liguria
19	Near Toirano	Savona	Liguria
20	Left bank of the Rio Roburentello stream	Cuneo	Piedmont
21	Near Roaschia and near Rivoera	Cuneo	Piedmont
22	S. Bartolomeo Hill, S slope	Imperia	Liguria
23	Near Caravonica	Imperia	Liguria
24	Downstream Tenarda dam	Imperia	Liguria
25	Near Rocchetta Nervina	Imperia	Liguria
26	Near Tenda		France
27	Near Luceram		France
28	Between Peille and St. Martin de Peille		France
29	Near Aspremont		France

RESULTS

Eleven loci out of the 33 studied were monomorphic, showing the same allele in all the populations sampled: *Idh-2*, *NADH-dh*, *Np*, *Sod-1*, *Sod-2*, *Aat-2*, *Adk*, *Pep-C*, *Lap*, *Fum*, *Mpi*. The remaining 22 loci showed from two to four alleles per population. The pattern of allele frequencies at many loci concurred in showing a higher genetic variation in western populations, while samples from the eastern part of the range were genetically more homogeneous. This pattern is confirmed by the distribution of the private alleles (i.e., alleles found in a single population; NEEL 1973): 15 over 18 private alleles where in the samples from the western part of the

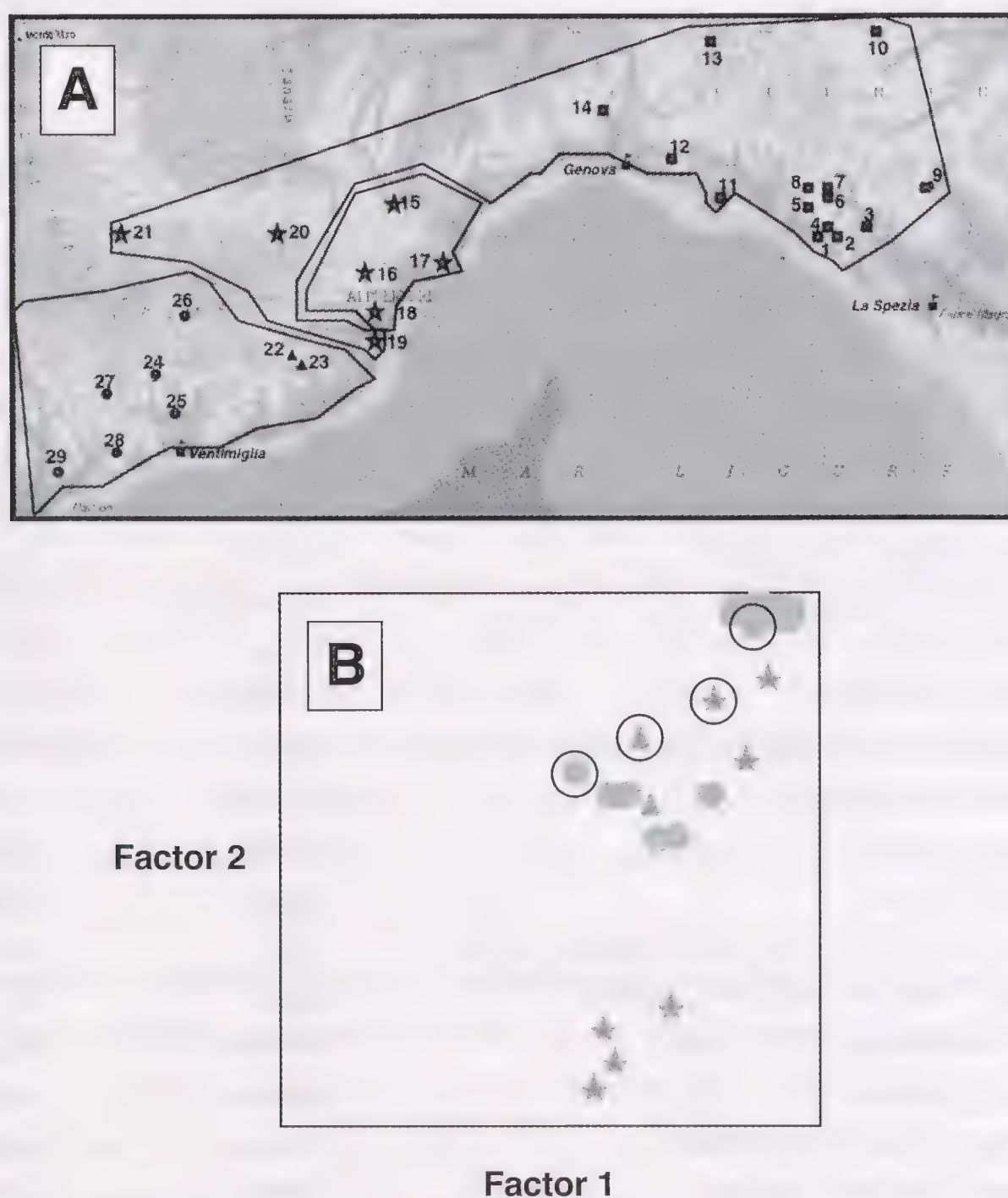


Fig. 1 - A) Geographical distribution of the studied populations, symbols refer to the subspecies to which they were ascribed on morphological ground. B) PCA based on allele frequencies, the percentage of the total variance explained is 88.7 (80.6 is explained by Factor 1). The *terra typica* of each subspecies is circled.

■ (squares) *S. s. ligusticus*, ★ (stars) *S. s. argentatus* and "nameless" samples from Finalese (15-18), ▲ (triangles) *S. s. bonzanoi*, ● (circles) *S. s. strinati*.

Table 2 - Parameters of genetic variability in the 29 studied populations of *S. stri-natii*. Standard errors are in parentheses.

Population	\underline{A}	P_{99}	P_{95}	H_o	H_e
1.	1.1	12.1	6.1	0.009 (0.005)	0.011 (0.006)
2.	1.1	9.1	9.1	0.047 (0.029)	0.035 (0.020)
3.	1.1	6.1	6.1	0.027 (0.019)	0.023 (0.016)
4.	1.1	9.1	9.1	0.022 (0.013)	0.022 (0.013)
5.	1.1	6.1	3.0	0.010 (0.008)	0.009 (0.007)
6.	1.1	6.1	3.0	0.007 (0.006)	0.007 (0.005)
7.	1.1	6.1	6.1	0.018 (0.012)	0.022 (0.016)
8.	1.1	12.1	12.1	0.034 (0.020)	0.028 (0.015)
9.	1.1	6.1	6.1	0.014 (0.010)	0.019 (0.015)
10.	1.0	3.0	3.0	0.013 (0.013)	0.011 (0.011)
11.	1.1	9.1	9.1	0.031 (0.018)	0.037 (0.022)
12.	1.1	9.1	9.1	0.035 (0.022)	0.030 (0.018)
13.	1.1	9.1	9.1	0.025 (0.016)	0.027 (0.017)
14.	1.1	9.1	9.1	0.027 (0.017)	0.024 (0.015)
15.	1.1	9.1	9.1	0.036 (0.022)	0.031 (0.018)
16.	1.2	21.2	21.2	0.079 (0.030)	0.085 (0.031)
17.	1.2	18.2	18.2	0.062 (0.028)	0.056 (0.024)
18.	1.2	15.2	15.2	0.052 (0.025)	0.050 (0.024)
19.	1.4	33.3	18.2	0.079 (0.028)	0.077 (0.027)
20.	1.1	12.1	12.1	0.041 (0.022)	0.043 (0.023)
21.	1.1	6.1	6.1	0.020 (0.015)	0.021 (0.015)

Table 2 - (Continued) Parameters of genetic variability in the 29 studied populations of *S. strinati*. Standard errors are in parentheses.

Population	<u>A</u>	P_{99}	P_{95}	H_o	H_e
22.	1.4	36.4	30.3	0.093 (0.027)	0.125 (0.036)
23.	1.3	27.3	27.3	0.108 (0.034)	0.108 (0.034)
24.	1.4	30.3	21.2	0.088 (0.030)	0.091 (0.031)
25.	1.3	24.2	24.2	0.093 (0.031)	0.096 (0.031)
26.	1.2	24.2	24.2	0.091 (0.032)	0.085 (0.030)
27.	1.2	18.2	18.2	0.081 (0.032)	0.075 (0.030)
28.	1.3	21.2	15.2	0.048 (0.020)	0.065 (0.026)
29.	1.3	27.3	24.2	0.077 (0.026)	0.089 (0.030)

range (samples 15-29), while only three have been found in the 14 easternmost populations. Moreover, all the private alleles with frequencies higher than 10% have been found in western populations. The higher genetic variation of westernmost populations is also evidenced by the values of genetic variability parameters (Tab. 2). In the easternmost populations (1-14) the averaged expected heterozygosity was 0.022 (range 0.007-0.037) and the percentage of polymorphic loci (P_{99}) had a mean value of 8.0% and a range of 3-12.1%. The values observed for the samples 15-21 were higher, with mean values of H_e reaching 0.052 (range 0.021-0.085) and P_{99} between 6.1-33.3 (mean value 16.5). The western populations (samples 22-29) show the highest levels of genetic variability, with heterozygosity values ranging between 0.065 and 0.125 and a percentage of polymorphic loci from 18.2 to 36.4. Mean values of these parameters were $H_e=0.092$ and $P_{99}=26.1$, two to four times those recorded for the other populations.

The PCA evidences three main groups of samples (fig. 1B). The group in the upper-right part of the graph clusters the eastern samples, which are very similar to each other, in spite they are

scattered over a half of the whole range of the species. This group corresponds to the subspecies *S. s. ligusticus* (Stefani, 1969), being the *terra typica* of this taxon Valdetaro Cave, near Rapallo (sample 11). A second group was represented by the westernmost populations (samples 22-29), including the samples (22-23) so far described as *S. s. bonzanoi* (Bruno & Bologna 1973) and *S. s. strinatii* (Aellen, 1958) (samples 24-29). The samples belonging to the subspecies *S. s. argentatus* (Stefani, 1969) (samples 19-21) and those belonging to a nameless form (15-18) were split in two differentiated groups. The first group (samples 19-21) was close to *S. s. ligusticus*. The second group was in the lower part of the graph and includes the Ligurian populations from the "Finalese" area (samples 15-18). These four populations are the most genetically differentiated in spite they are located in the central part of the species range. Therefore, PCA indicates that three main population groups could be found within *S. strinatii*: western populations (22-29), samples from "Finalese" (15-18), and eastern populations (1-14 and 19-21).

Table 3 - Genetic distances calculated according to Rogers' method (WRIGHT, 1978) for the three population groups identified within *S. strinatii*. Mean values below the diagonal, range of distances above the diagonal. On the diagonal are the ranges within each group.

Population group	"Eastern"	"Finalese"	"Western"
"Eastern" (samples 1-14,19-21)	0.008 – 0.212	0.251 – 0.374	0.196 – 0.375
"Finalese" (samples 15-18)	0.312	0.068 – 0.174	0.205 – 0.381
"Western" (samples 22-29)	0.247	0.292	0.108 – 0.344

The genetic distances calculated according to Rogers' method (WRIGHT 1978) supported the identification of three population groups (Table 3). The eastern samples (1-14 and 19-21) are shown to have a quite low genetic differentiation, with the easternmost populations (samples 1-14) showing very low D_{Rogers} (between 0.008 and 0.141), that slightly grew to 0.127-0.212 when the three samples from the central part of the range (19-21) are added. The populations from western range (samples 22-29) are well differenti-

ated both from the other population groups (D_{Rogers} between 0.196 and 0.381) and among them (ranging 0.108-0.344), confirming the genetic heterogeneity of this cluster. Finally, the populations 15-18 from “Finalese” are confirmed as highly differentiated, showing the highest recorded average distance from the other populations (average D_{Rogers} 0.312).

Table 4 - Mean genetic distances (D_{Nei} , NEI, 1972, below the diagonal) and divergence times in years (t , NEI, 1975, above the diagonal) between the three genetically characterised forms identified within *S. strinatii*.

Population group	“Eastern”	“Finalese”	“Western”
“Eastern” form (samples 1-14,19-21)	-	$t = 590.000$	$t = 375.000$
“Finalese” form (samples 15-18)	$D_{\text{Nei}} = 0.118$	-	$t = 500.000$
“Western” form (samples 22-29)	$D_{\text{Nei}} = 0.075$	$D_{\text{Nei}} = 0.100$	-

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The results obtained allowed the identification of three genetically and geographically characterised groups of populations. A genetically homogeneous group occupies a wide area (samples 1-14 from the eastern part of the range) and is genetically close to the population group from the western area (19-21). The relatively small westernmost part of the range hosts populations (22-29) that are highly differentiated both among them and from the other clusters identified. Finally, the most divergent population group is located in the central part of the range and covers a very small area in the “Finalese” region (samples 15-18).

From a taxonomic point of view, it was hard to find out a correspondence between these three groups and the formally described morphological subspecies. The “eastern” group (1-14 and 19-21) includes the *terra typica* of the subspecies *S. s. ligusticus* (Stefani, 1969), but also that of *S. s. argentatus* (Stefani, 1969) (cave Grotta delle Ruccaie, near Toirano, sample 19), along with the populations from Roburent area, usually included in this last subspecies. In the westernmost group are clustered all together the populations classified as *S. s. strinatii* (Aellen, 1958) (with the *terra typica*: the cave

Grotte d'Aspremont, n. 29) and *S. s. bonzanoi* (Bruno & Bologna, 1973) (samples 22 and 23, with this latter as the *terra typica* from the cave Tana I^a du Casà). The most genetically differentiated cluster from the Finalese area does not include any *terra typica*. These results clearly indicate that the so far proposed subspecies are inconsistent with the genetic structure of the species.

The genetic subdivision of *S. strinatii* in the three above identified population groups was consistent with the paleoclimatic history and the orography of the species' range. It is known that the speciation process in *Speleomantes* occurs mainly by divergence in allopatry, as in the larger part of plethodontids (GARCÍA-PARÍS *et alii* 2000), and is strongly influenced by paleoclimatic events via the rising of geographic barriers allowing the differentiation via mutation sum (FORTI *et alii* 1998; CIMMARUTA *et alii* 1998). In particular, it has been speculated that the glaciations played an important role at the evolutionary level, allowing the origination of the extant species by means of the alternation of glacial and interglacial periods during Quaternary (FORTI *et alii* 1998).

To test for the influence of glacial events on the genetic structuring of *S. strinatii*, the genetic distances between the so far identified groups of populations have been used to estimate the divergence times among them, according to Nei's calibration (NEI 1975). The obtained times have been compared with the paleoclimatic events occurred in the area, in particular with glacial/interglacial stages, in order to determinate if glacials can be identified as subdividing events, promoting population fragmentation and producing the extant articulated genetic structure of the species. These results are reported in Tab. 4.

The divergence of the most differentiated group from the Finalese area started during glacial stages: during Günz with respect to the "eastern" group (about 590.000 ya) and during Mindel (about 500.000 ya) with respect to the "western" group. In the Mediterranean area, the glacial stages were characterised by a dry and cold climate, while the interglacials had a more mild and humid climate (WEST 1969; BERTOLANI-MARCHETTI 1985; PIGNATTI 1994). As a consequence, arboreal vegetation and animal species were restricted in warmer refugia at low altitude and along coastal areas during the glacials. The populations from the Finalese live in a small area,

completely surrounded by relatively high mountains (Mt. Settepani, Mt. Carmo, Mt. Beigua), that have probably acted as efficacious geographic barriers during ice ages, causing isolation and differentiation of the local remnant population group.

The divergence of the two most far apart population groups (westernmost vs. easternmost) cannot be reconnected to a glacial stage. It is dated 350-400.000 years ago, at an interglacial stage, when higher altitude sites were colonised due to the range expansion of the arboreal vegetation. The genetic pattern of the “eastern” population group suggests a relatively recent range expansion, as witnessed by its high genetic homogeneity. Moreover, the close similarity with the populations from the Roburent area (samples 19-21), suggests an Apennine colonisation route from Emilia and Tuscany to western Liguria. The slightly higher genetic variability observed in the Roburent samples could be due to the “secondary contact” between the re-established populations invading the area and those resident in the Maritime Alps.

This scenario is supported by the observed pattern of allele frequencies in the populations from Roburent area, holding “western alleles” together with the more common “eastern alleles”. Moreover, the Maritime Alps are a well known suture zone for either plant and animal species and the depicted pattern has been proposed for many other taxa (KROPF *et alii* 2002 and references herein). This scenario could explain the impossibility of dating the divergence time between easternmost and westernmost population groups, being the data affected by the subsequent contact and gene flow between these two forms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to many people who helped in collecting the studied specimens and in particular to Mr S. Zoia, who showed us a number of caves in eastern Liguria, and to the Gruppo Speleologico Imperiese (CAI).

REFERENCES

- AELLEN V., 1958 - Sur une nouvelle forme d'*Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Senck. biol.*, Frankfurt am Main, 39: 155-163.
- BERTOLANI-MARCHETTI D., 1985 - Pollen paleoclimatology in the Mediterranean since the Messinian time (pp. 525-543) - In: STANLEY D.J. & WEZEL F.C., (Eds.), Geological evolution of the Mediterranean Basin. Springer-Verlag, New York, 571 pp.
- BRUNO S. & BOLOGNA M., 1973 - L'*Hydromantes italicus* Dunn, 1923 nella Liguria occidentale e descrizione di una nuova sottospecie (Studi sulla Fauna Erpetologica Italiana. XVI) (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Atti Soc. ital. Sci. nat. Mus. Civ. St. nat. Milano*, 114: 81-92.
- CIMMARUTA R., FORTI G., NASCETTI G. & BULLINI L., 1999 - Spatial distribution and competition in two parapatric sibling species of European plethodontid salamanders - *Ethol., Ecol. & Evol.*, Firenze, 11: 383-398.
- CIMMARUTA R., NASCETTI G., FORTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Paleogeografia della Sardegna ed evoluzione degli *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 183-195.
- COMES H.P. & KADEREIT J.W., 1998 - The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution - *Trends in Plant Science*, Oxford, 3: 432-438.
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Glaciazioni del Quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 197-211.
- GARCÍA-PARÍS M., GOOD D.A., PARRA-OLEA G. & WAKE D.B., 2000 - Biodiversity of Costa Rican salamanders: Implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation - *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 97: 1640-1647.
- HEWITT G.M., 2000 - The genetic legacy of the Quaternary ice ages - *Nature*, London, 405: 907-913.
- KOHEN R.K. & EANES W.F., 1978 - Molecular structure and protein variation within and among populations - *Evol. Biol.*, Amsterdam, 11: 39-100.
- KROPF M., KADEREIT J.W. & COMES H.P., 2002 - Late Quaternary distributional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllis montana* L. (Fabaceae) inferred from ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers - *Mol. Ecol.*, Oxford, 11: 447-463.
- LANZA B., 1999 - Plethodontidae - Lungenlose Salamander (pp. 77-204) - In: GROSSENBACHER K. & THIESMEIER B. (Eds.), Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 4/1: Schwanzlurche (Urodela) I. Aula Verlag, Wiesbaden, 408 pp.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G. & BULLINI L., 1995 - Morphologic and genetic studies of the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) - *Monogr. Mus. reg. Sc. nat.*, Torino, 16, 368 pp.
- LANZA B., CIMMARUTA R., FORTI G., BULLINI L. & NASCETTI G., 2005 - Bianchi's cave salamander, *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. Sc. nat. G. Doria*, Genova, 97: 59-77.
- NASCETTI G., CIMMARUTA R., LANZA B. & BULLINI L., 1996 - Molecular taxonomy of European plethodontid salamanders (Genus *Hydromantes*) - *J. Herpet.*, Lawrence, 30: 161-183.

- NEEL M., 1973 - Private variants and the frequency of mutation among South American Indians - *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 70: 3311-3315.
- NEI M., 1972 - Genetic distance between populations - *Amer. Natur.*, Chicago, 106: 283-292.
- NEI M., 1975 - Molecular population genetics and evolution - Am. Elsevier, New York, 290 pp.
- PIGNATTI S., 1994 - Ecologia del paesaggio - UTET, Torino, 228 pp.
- SALVIDIO S., LATTES A., TAVANO M., MELODIA F. & PASTORINO M.V., 1994 - Ecology of a *Speleomantes ambrosii* population inhabiting an artificial tunnel - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 15: 35-45.
- SARICH V.M., 1977 - Rates, sample sizes and the neutrality hypothesis for the electrophoresis in evolutionary studies - *Nature*, London, 263: 24-28.
- STEFANI R., 1969 - La distribuzione geografica e l'evoluzione del geotritone sardo (*Hydromantes genei* Schleg.) e del geotritone continentale europeo (*Hydromantes italicus* Dunn) - *Arch. zool. ital.*, Napoli, 53 (1968): 207-243.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B., 1989 - BIOSYS-1: a computer programme for the analysis of allelic variation in genetics and biochemical systematics. Release 1.7. - Department of Genetics and Development, University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois.
- WEST R.G., 1968 - Pleistocene geology and biology. Longmans, Green and Co., LTD, London, 377 pp.
- WILKINSON L., HILL M.A. & VANG E., 1992 - SYSTAT, Version 5.2 Edition. - SYSTAT Inc., Evanston, IL, 724 pp.
- WRIGHT S., 1978 - Evolution and genetic of populations, Vol 4, Variability within and among natural populations - University of Chicago Press, Chicago, IL, 565 pp.

ABSTRACT

The genetic structure of the plethodontid salamander *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) has been analysed by means of allozyme electrophoresis. The studied samples were taken from the whole range of the species (north-western Italy and south-eastern France), to assess the degree and the pattern of genetic differentiation and to find out possible correlation with the paleoclimatic history of the area. The results obtained showed three genetically characterised population groups, whose distribution and levels of differentiation were related to the quaternary alternation of glacial and interglacial stages in the region. The subdivision of this species in four morphological subspecies is not supported by the genetic structure here evidenced.

RIASSUNTO

Gli effetti delle glaciazioni quaternarie sulla struttura genetica di *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) (Amphibia, Plethodontidae).

La struttura genetica del geotritone *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) è stata analizzata mediante analisi elettroforetica di sistemi gene-enzima, su popolazioni campionate in tutto l'areale della specie. Il grado di eterogeneità inter- ed intrapopolazionale, i livelli di variabilità e le relazioni di affinità genetica tra le varie popolazioni sono stati confrontati con la storia paleoclimatologica dell'area per configurare i possibili processi microevolutivi che hanno originato l'attuale struttura genetica della specie. I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di tre gruppi di popolazioni geneticamente ben caratterizzati, la cui origine è probabilmente riconducibile all'influenza dell'alternarsi dei periodi glaciali ed interglaciali del Quaternario. I dati ottenuti sono stati anche utilizzati per verificare la validità delle sottospecie morfologiche attualmente riconosciute, che non risultano essere sostenute da basi genetiche ed evolutive.

GIANLUCA FORTI*, BENEDETTO LANZA**,
ROBERTA CIMMARUTA*** & GIUSEPPE NASCETTI***

AN EXPERIMENT OF ARTIFICIAL SYNTOPY *EX SITU*
BETWEEN *SPELEOMANTES ITALICUS* (DUNN, 1923)
AND *S. AMBROSII AMBROSII* (LANZA, 1955)

(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

The levels of genetic divergence observed within and between *Speleomantes* taxa are not correlated to their morphological differentiation, a feature typical of plethodontid salamanders (WAKE *et alii* 1983). To assess correctly the taxonomic status and the species boundaries it is therefore essential to evaluate the degree of reproductive isolation between population groups (LANZA *et alii* 1995; NASCETTI *et alii* 1996). When taxa are allopatric or parapatric without syntopy, differentiation indices such as genetic distances could be inadequate. In these cases to bring in syntopy allopatric populations whose individuals are distinguishable using genetic markers (e.g. discriminant alleles) may give relevant information (COLUZZI & BULLINI 1971). However, in the case of plethodontid salamanders the experimental plan is so demanding and time consuming that has been judged to be unfeasible and scarcely useful (WAKE 1981). Recent results have on the contrary demonstrated that such experiments can supply relevant data about the ecological and evolution-

* Museo del Fiore, Piazza G. Fabrizio 17, 01021 Acquapendente (VT), Italia; e-mail: museo.fiore@tin.it

** Dipartimento di Biologia Animale e Genetica & Museo di Storia Naturale (Sezione Zoologica «La Specola»), Università di Firenze, Via Romana 17, 50125 Firenze, Italia; e-mail: benedetto.lanza@tin.it

*** Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università della Tuscia, Via S. Giovanni Decollato 1, 01100 Viterbo, Italia; e-mail: cimmaruta@unitus.it & nascetti@unitus.it

ary relationships among plethodontid species, provided they are run for long time enough (CIMMARUTA *et alii* 1999).

The range of *S. ambrosii* (Lanza, 1955), in northern Tuscany and eastern Liguria, is neighbouring to the ranges of *S. italicus* (Dunn, 1923) and *S. strinati* (Aellen, 1958). Two different subspecies have been recently described, geographically separated by the Magra River. *Speleomantes ambrosii ambrosii* lives in the area of La Spezia province situated on the hydrographic right side of the Magra River; *S. ambrosii bianchii* (Lanza *et alii* 2005) inhabits the southern part of the province of Massa Carrara, i.e. on the left side of the Magra River (LANZA *et alii* 2005).

Speleomantes italicus and *S. a. bianchii* are known to meet and hybridize on the Apuan Alps, originating a strongly asymmetric introgression at the level of nuclear genes, without a complete blending of the two gene pools that remain substantially separated at the level of mtDNA (CIMMARUTA *et alii* 1989; RUGGI *et alii* 2005). *Speleomantes a. ambrosii* and *S. strinati* are parapatric in eastern Liguria and neither syntopy nor hybridization have been observed in this area (CIMMARUTA *et alii* 1999). Within *S. a. ambrosii*, however, the populations from the lower Magra Valley are genetically quite differentiated, because they show alleles shared by both *S. italicus* and *S. strinati* but not typical of *S. ambrosii* (CIMMARUTA 1993; FORTI 1998). The presence of these alleles within *S. a. ambrosii* gene pool can be explained through hybridization between *S. a. ambrosii* and either *S. italicus* or *S. strinati*.

Since careful field surveys did not allow the finding of any contact zone in the high Magra Valley area, nor of *Speleomantes* populations in the area between Pontremoli and the lower Magra Valley, two experiments of artificial syntopy in the wild have been carried out, bringing *S. a. ambrosii* together with *S. strinati* (CIMMARUTA *et alii* 1999) and with *S. italicus*. This last experiment, planned and started before the discovery of the hybrid zone in the Apuan Alps, has been carried out in a natural cave outside the range of both the involved species, to test for reproductive isolation mechanisms between *S. a. ambrosii* and *S. italicus* and to study the viability and fitness of their possible hybrids.

MATERIALS AND METHODS

The site chosen to carry out the experiment of artificial syntopy in the field was the limestone cave "Buca della Nebbia" just South of Fungaia (Siena), municipality of Monteriggioni, on the southern slope of Maggio Mt. at 315 m of height (cadastral number 257 T/SI, coordinates 43°20'09"N – 11°14'14"E of Greenwich). The site environment is relatively xeric and is characterized by a thermophilous vegetation: deciduous broad-leaved wood dominated by holm oaks (*Quercus ilex* L.) and downy oaks (*Q. pubescens* Willd). This site was outside the range of both the species involved, in order to keep the experiment under control and to avoid spreading a foreign species into the range of another one.

The artificial syntopy has been realised using specimens from two populations of *S. italicus* and *S. a. ambrosii* that were distinguishable by their dorsal colour pattern (LANZA *et alii* 1995). Thirty adults of *S. a. ambrosii* (16 males and 14 females) and 30 specimens of *S. italicus* (13 males, 14 females, 3 subadults) were introduced in the cave "Buca della Nebbia". *S. a. ambrosii* specimens were taken from a very narrow, temporarily waterless stream bed, covered by leaf litter and stones, near the cave "Grotta della Taglia" (cadastral number 79Li/SP, 44°06'03"N - 09°47'27"E of Greenwich), 200-220 m of height, locality Colle Mantellina, "frazione" Pegazzano, municipality of La Spezia. This is a relatively xeric environment, covered by an oak wood (*Quercus ilex* L.) with chestnut trees (*Castanea sativa* Miller) and *Q. pubescens* Willd. The specimens of *S. italicus* were collected in the northern slope of the sandstone (arenaria macigno) hill "Colle di San Francesco", close to Pian di Mugnone (about 43°48'N - 11°17'E), municipality of Fiesole (Florence), at 170-190 m of height. This is a relatively mesic area, covered by a close chestnut wood (*Castanea sativa* Miller) mixed with *Robinia pseudoacacia* L.

The experiment started on 2 April 1983. Animals were released in the deeper part of the cave, on top of the last room (fig. 1). During the subsequent 16 years, 35 surveys were carried out in the site, from 9 April 1983 to 11 April 1999. Till 16 May 1996 the temperature, the humidity and the number of specimens of both species, assessed on morphological basis, were recorded. During the control session of 16 May 1996 newborn individuals were recorded in the cave for the first time (by B. Campolmi and B. Lanza), 13

years after the beginning of the experiment (LANZA 1999, p. 102). Since this moment the control protocol was modified, including measurements of the observed salamanders: weight (W), total length (L), snout-vent length (SVL).

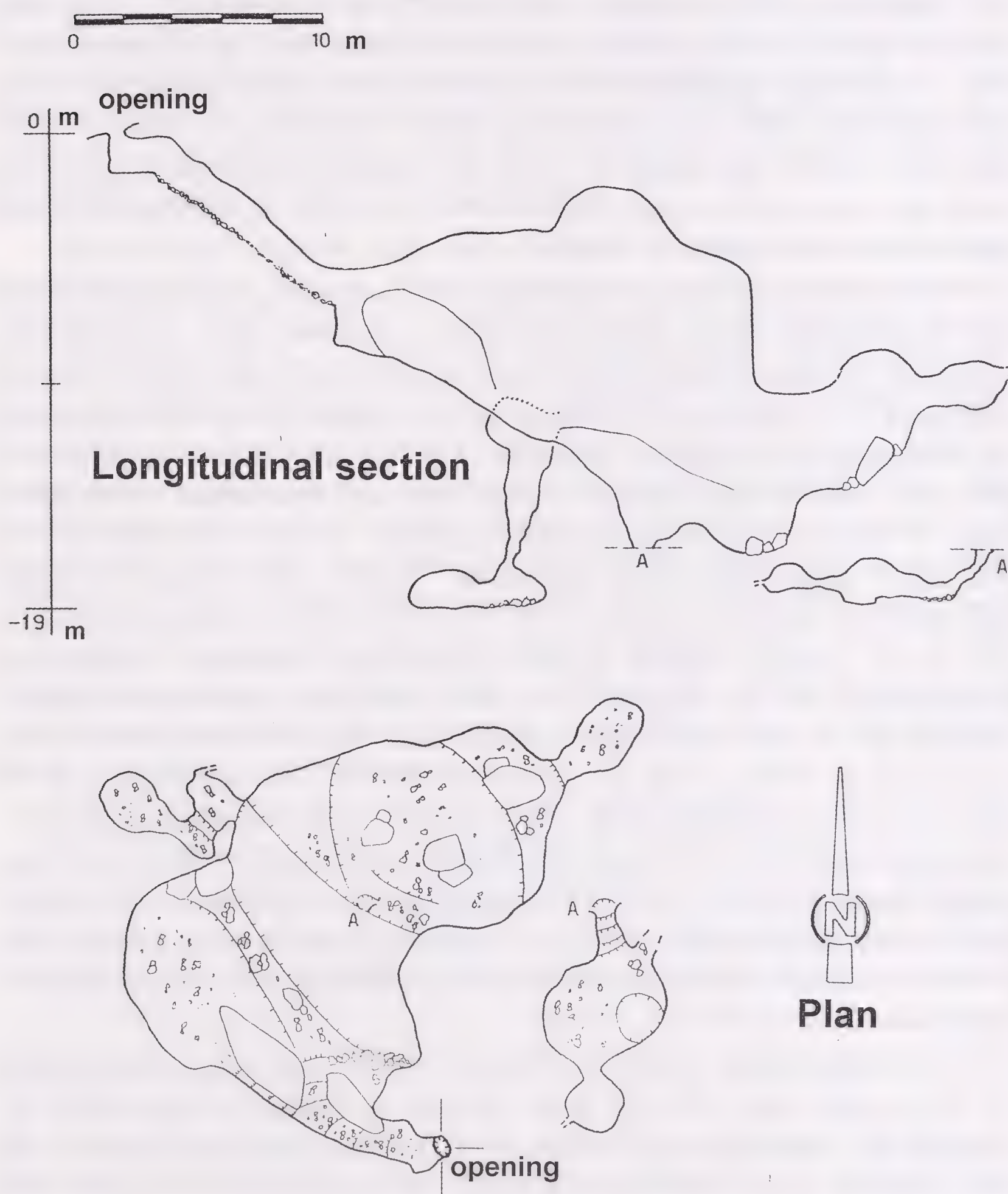


Fig. 1 - Longitudinal section and plan of the cave "Buca della Nebbia" (cadastral number 257 T/SI) used for the artificial syntopy experiment. Survey by F. Fallani and G. Adiodati (Gruppo Speleologico Fiorentino, C.A.I.), drawing by F. Fallani.

Specimens were also marked singularly by individual toe-clipping. This allowed estimating the population size (N) by mark-recapture method, using CHAPMAN (1951) index. Being the phalanx cut a temporary mark, specimens have been also photographed to allow their further identification using dorsal colour pattern. During each survey conducted after 16 May 1996, a small piece of the tail was taken from each newly captured specimen to assess its genotype (*S. a. ambrosii*, *S. italicus*, F_1 hybrid or backcross) using allozyme electrophoresis. To this aim, were scored five loci of the six discriminating between *S. a. ambrosii* and *S. italicus*: *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Sod-1*, *Ck* and *Ada-1* (LANZA *et alii* 1995; FORTI *et alii* 1998) on an overall number of 55 salamanders. The electrophoretic methods were those reported in detail by LANZA *et alii* (1995, 2005).

RESULTS

Thirty-five control surveys were carried out in the experimental cave between 9 April 1983 and 11 April 1999. In 24 of these control sessions (68.8%) *Speleomantes* specimens were observed in the site. All the specimens were initially released at the end of the cave but were always recovered within the first 10 m. The higher number of observations was recorded in autumn and spring (seasonal mean; fig. 2). This is probably due to the scarce effectiveness of the cave itself as a refuge, since it undergoes marked changes in temperature and humidity especially during the summer, becoming a scarcely suitable habitat and preventing high concentration of *Speleomantes* inside.

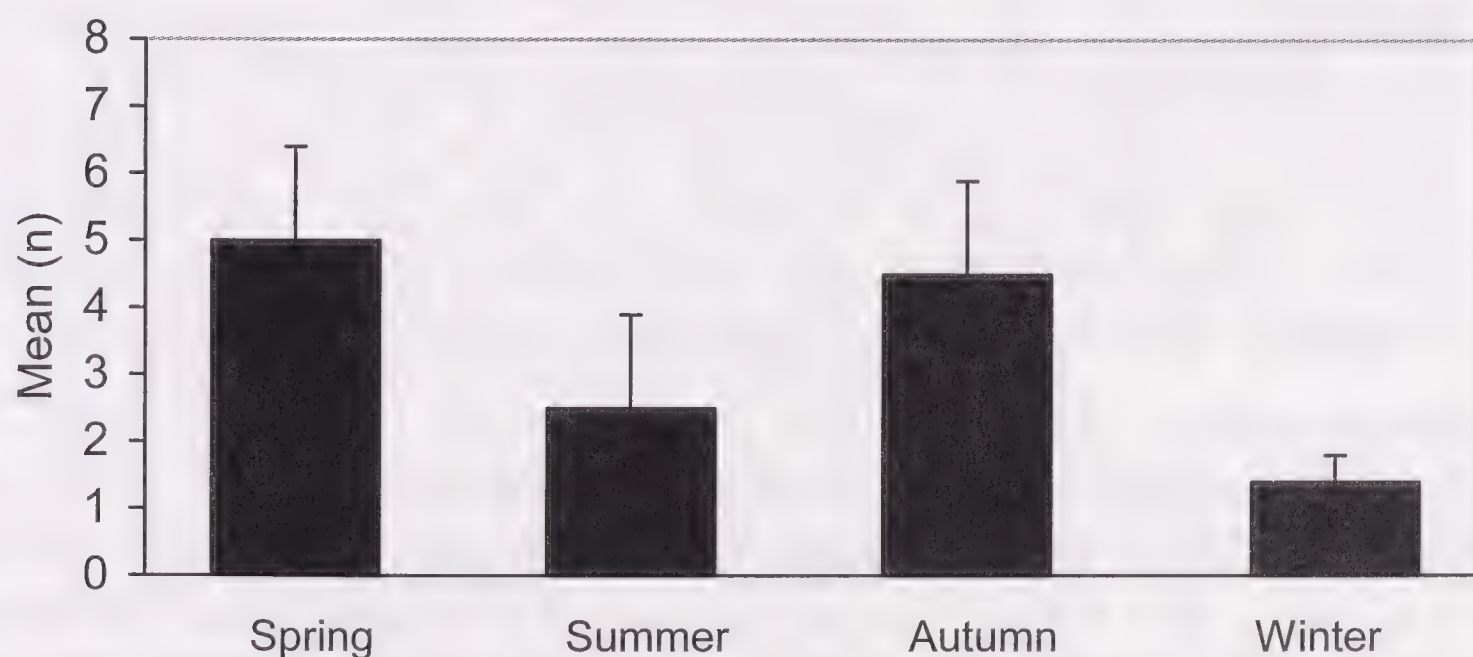


Fig. 2 - Seasonal means of *Speleomantes* specimens in the cave "Buca della Nebbia". Total number of observations: $N = 114$.

During a first period (9 April 1983 - 16 May 1996) 17 surveys have been carried out and in 59% (10 surveys) it was possible to find introduced individuals of both species within the cave, providing an overall number of 35 adult observations. Several surveys (41%; i.e., 7 surveys, with 28 observations) were carried out during the first year after the starting date, to check for the survival of the introduced specimens in the site, a result not to be taken for granted, because the site is outside the range of the genus.

The mean number of specimens recorded per session was very low (4 ± 1.05 vs. 60 specimens introduced), but both species were still living in the site in 1989, when the surveys were stopped for 4 years. Adults of both species were still there in 1993, when controls started again. During the survey carried out on 16 May 1996, newborn specimens were found for the first time. Since this moment a second phase started up, with a different sampling protocol (see Materials and Methods). Between 16 May 1996 and 11 April 1999, 18 surveys have been executed, with 79 specimens of the two species observed, with a mean of 4.39 (± 0.89) individuals per survey.

The population size estimated in 1996 was $N = 41$ (± 9.8) and overall 55 different individuals were observed between 1996 and 1999, including unmarked newborns. Young specimens were slightly more numerous than adults (55% vs. 45%). Twenty specimens were then recaptured during further controls, usually within 2-4 months after marking. In 3 cases, however, specimens were recaptured 20-29 months after being marked.

All the 55 observed specimens were classified as *S. a. ambrosii*, *S. italicus*, F_1 hybrids or backcrosses using allozyme markers. Most of the salamanders were *S. a. ambrosii*, with 38 (69%) young and adult specimens recorded (Fig. 3), while only two adults (4%) of *S. italicus* were observed. Fifteen specimens (27%) were hybrids, both young and adult. The bulk was F_1 hybrids (13) but also two adult backcrosses $F_1 \times S. italicus$ were found. None of the young born in the site was *S. italicus*: 70% were *S. a. ambrosii* and the others were hybrids.

Morphometric data obtained during years 1996-1999 have provided some preliminary indication on the growth rate of *Speleomanes*. A male of *S. a. ambrosii* captured on 16 May 1996 (L= 110 mm, SVL= 62 mm, W= 4.4 g) was recaptured 8.5 months later, showing a growth of 2 mm of SVL and an increase of 0.7 g in weight. A young *S. a. ambrosii* captured on 16 May 1996 (L= 45 mm, SVL= 25.5 mm,

W= 0.4 g) during the same 8.5 months increased 1.5 mm in SVL and 0.2 g in weight. A female F_1 hybrid captured on 23 November 1996 (L= 119 mm, SVL= 66 mm, W= 5.6 g) was recaptured 2 years later, showing a growth of 0,5 mm of SVL.

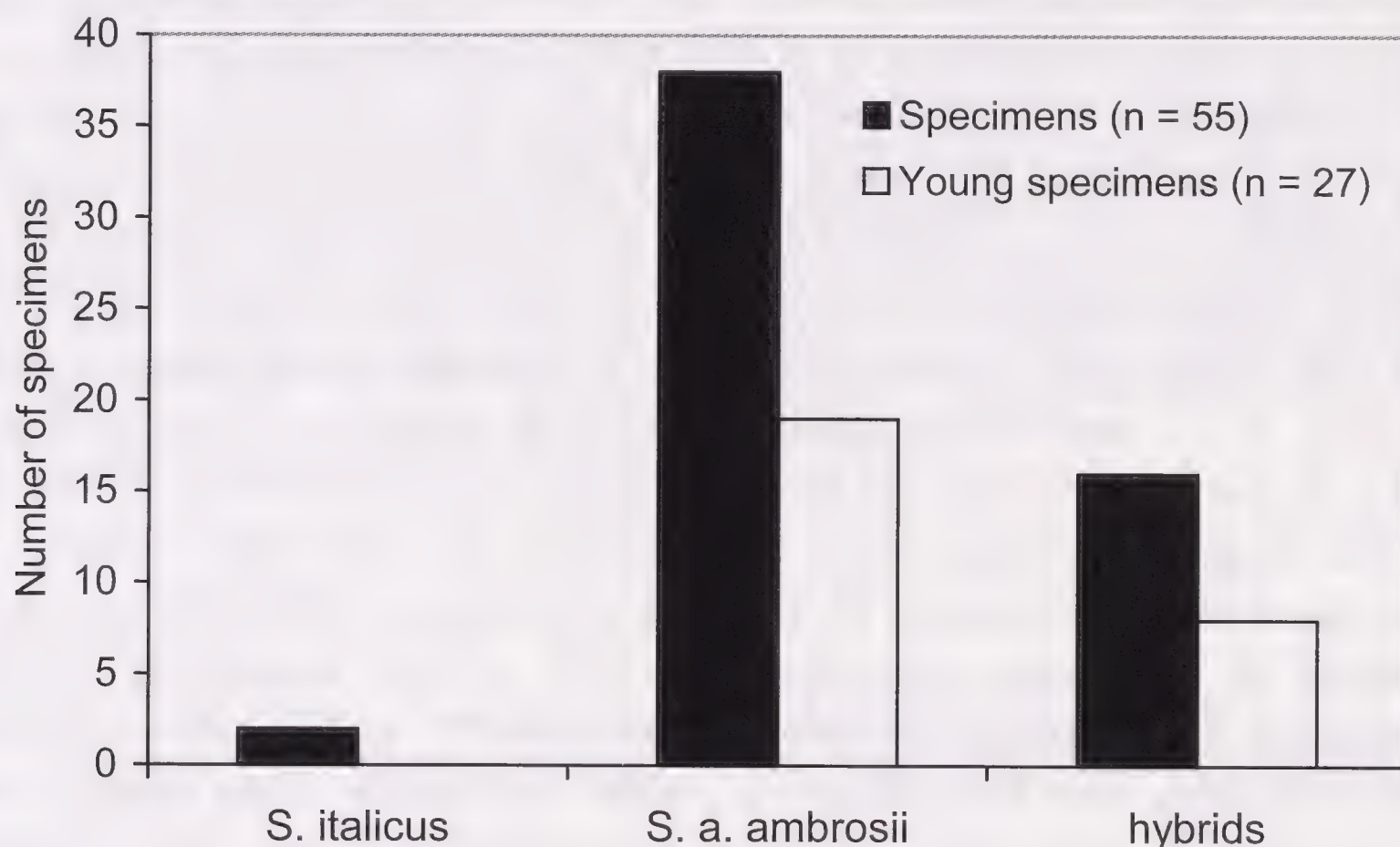


Fig. 3 - Specimens of *S. ambrosii*, *S. italicus* and hybrids observed in the second phase of the experiment (i.e. since newborns have been detected) ($N = 55$).

DISCUSSION

The results obtained show that the site chosen to carry out the experiment of artificial syntopy between *S. a. ambrosii* and *S. italicus* was suitable to host a viable *Speleomantes* population. The environmental conditions of the surface area are quite xeric and strongly influence the initial part of the cave environment, that becomes drier and warmer at summer time, as indicated by the bimodal distribution of *Speleomantes* frequencies shown in fig. 2 (see also PASTORELLI *et alii* 2001; FORTI *et alii* 2005).

Being the cave a poor refuge, it can not host a large *Speleomantes* population, as confirmed by the census data, providing an estimate of $N = 41 (\pm 9.8)$.

Speleomantes a. ambrosii seems to be better settled in the site, as suggested by its higher demographic abundance (fig. 3) and repro-

ductive success; *S. italicus* is still inhabiting the site but shows lower densities with respect to *S. ambrosii* and does not produce new-borns in spite the adults are reproductively active, as shown by the birth of hybrids and backcrosses. This could be due to the fact that *S. a. ambrosii* individuals were from a site whose ecological features were relatively xeric, suggesting a slight pre-adaptation of the former to the environmental conditions of the xeric experimental site. Moreover, *S. a. ambrosii* has been already demonstrated able to survive successfully in xeric Mediterranean habitats, probably because of its high ecological plasticity (CIMMARUTA *et alii* 1999; FORTI *et alii* 2005).

The finding of young and adult F_1 hybrids shows that *S. italicus* and *S. a. ambrosii* hybridize when in syntopy. During the 16 years of the experiment the hybridization occurred several times and is still frequently happening, as witnessed by the high number of hybrids observed. Indeed, F_1 hybrids represented 12% of the overall number of specimens recorded and 25% of the young individuals. Moreover, the finding of two backcrosses $F_1 \times S. italicus$ already adult indicates that hybrids were viable and fertile. This finding also attests that at least three generations occurred in the experimental site during the 16 years of the experiment.

CONCLUSIONS

This experiment demonstrates that transplantation experiments can be successfully carried out in plethodontid salamanders in spite their long generation time.

The results obtained showed that *S. a. ambrosii* and *S. italicus* hybridize producing viable and fertile hybrids, able to backcross with parental specimens. This allows to make a hypothesis to explain the origin of the “foreign” alleles carried by the populations of *S. a. ambrosii* from La Spezia, shared by both *S. italicus* and *S. strinatii* but not typical of *S. ambrosii* (CIMMARUTA 1993; FORTI 1998). These alleles could be the signs of a past hybridization (paleointrogression) with *S. italicus*, rather than with *S. strinatii*: this study shows indeed that *S. a. ambrosii* hybridize at a high rate with *S. italicus*. On the contrary, it has been previously demonstrated that *S. a. ambrosii* and *S. strinatii* hybridize in a very limited extent when in syntopy (CIMMARUTA *et alii* 1999), making a past hybridization *S. a. ambrosii* \times *S.*

strinatii less reliable. Further studies on mtDNA are now running to test this hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted with all those who willingly helped in collecting the specimens to be transplanted and perseveringly participated in the 16 years-long survey of the experimental site: Fabrizio Falani and Giovanni Adiodati of Gruppo Speleologico Fiorentino of the Club Alpino Italiano (C.A.I.), Bruno Campolmi, Paola Giorgio Lanza, Stefano Vanni, Annamaria Nistri, Marcello Iaconelli, Eleonora Fileti, Alessandra Ruggi, Lucia Rovelli.

REFERENCES

- CHAPMAN D.G., 1951 - Some properties of the hypergeometric distribution with applications to zoological census - *Univ. Calif. Publ. Statistics*, Berkeley, 1: 131-160.
- CIMMARUTA R., 1993 - Ricerche di ecologia genetica ed evolutiva in Pletodontidi del genere *Speleomantes* (Amphibia: Plethodontidae) - Tesi di Dottorato di Ricerca, V Ciclo, Università degli Studi di Parma, Anno Accad. 1992-93, 130 pp.
- CIMMARUTA R., FORTI G., NASCETTI G. & BULLINI L., 1999 - Spatial distribution and competition in two parapatric sibling species of European plethodontid salamanders - *Ethol., Ecol. & Evol.*, Firenze, 11: 383-398.
- CIMMARUTA R., NASCETTI G. & BULLINI L., 1989 - A hybrid zone between the plethodontid salamanders *Hydromantes italicus* and *H. ambrosii* - Proc. II Congr. Europ. Soc. Evol. Biol. (E.S.E.B.), Roma: 17.
- COLUZZI M. & BULLINI L., 1971 - Enzyme variants as markers in the study of pre-copulatory isolating mechanisms - *Nature*, London, 231: 455-456.
- FORTI G., 1998 - Parapatry, competizione ed isolamento riproduttivo in specie gemelle del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - Tesi di Dottorato di Ricerca, XI Ciclo, Università degli Studi di Parma, Anno Accad. 1997-98, 62 pp.
- FORTI G., CIMMARUTA R. & NASCETTI G., 2005 - Behavioural responses to seasonal variations of autoecological parameters in populations of *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) and *S. ambrosii* (Lanza, 1955) (Amphibia, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova 97: 179-192.
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Glaciazioni del Quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 197-211.
- LANZA B., 1999 - *Speleomantes ambrosii* (Lanza, 1955) - Ambrosius Höhlensalamander (pp. 91-135) - In: GROSEMBAKER K. & THIESMEIER B. (Eds.), Handbuch

- der Reptilien und Amphibien Europas. Band 4/1: Schwanzlurche (Urodela) - I. Aula Verlag, Wiesbaden, 408 pp.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G. & BULLINI L., 1995 - Morphologic and genetic studies of the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) - *Monogr. Mus. reg. Sci. nat.*, Torino, 16, 368 pp.
- LANZA B., CIMMARUTA R., FORTI G., BULLINI L. & NASCETTI G., 2005 - Bianchi's cave salamander, *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 97: 59-77.
- NASCETTI G., CIMMARUTA R., LANZA B. & BULLINI L., 1996 - Molecular taxonomy of European plethodontid salamanders (Genus *Hydromantes*) - *J. Herpet.*, Lawrence, 30 (2): 161-183.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2001 - Studi preliminari sull'ecologia di *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) nell'Appennino tosco-romagnolo (Caudata: Plethodontidae) - *Pianura*, Cremona, 13: 347-351.
- RUGGI A., CIMMARUTA R., FORTI G. & NASCETTI G., 2005 - Preliminary study of a hybrid zone between *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) and *S. ambrosii* (Lanza, 1955) on the Apuan Alps, using RFLP analysis (Amphibia, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 97: 135-144.
- WAKE D.B., 1981 - The application of allozymes to problems in the evolution of morphology - Evolution today. Proc. II Intern. Congr. System. and Evol. Biol.: 257-270.
- WAKE D.B., ROTH G. & WAKE M.H., 1983 - On the problem of stasis in organismal evolution - *J. theor. Biol.*, Sidcup, 101: 211-224.

ABSTRACT

An experiment of artificial syntopy has been carried out in the field, to assess the degree of reproductive isolation between *S. a. ambrosii* and *S. italicus*, two taxa parapatrically distributed and never found syntopic. The site used for the experiment has been surveyed for 16 years and the results obtained have shown that the two taxa hybridize extensively when in syntopy and that hybrids are viable and fertile, as demonstrated by the finding of two backcrosses already grown adult.

Previous allozyme studies highlighted that *S. a. ambrosii* populations from La Spezia area have in their gene pool alleles that are not typical of this taxon, but belonging to both *S. italicus* and *S. strinatii*. Our results suggest that these alleles could be due to a past hybridization (paleointrogression) of *S. a. ambrosii* with *S. italicus* rather than with *S. strinatii*.

RIASSUNTO

Un esperimento di sintopia artificiale in natura tra *Speleomantes italicus* e *S. ambrosii ambrosii* (Amphibia, Plethodontidae).

E' stato condotto un esperimento di sintopia artificiale in natura per verificare il grado di isolamento riproduttivo tra *S. italicus* e *S. a. ambrosii* nonché la vitalità e la fertilità di eventuali ibridi. La realizzazione dell'esperimento è stata resa necessaria dalla distribuzione parapatrica senza sintopia di questi due taxa. I 16 anni di rilievi effettuati hanno dimostrato che i due taxa ibridano in sintopia e che gli ibridi prodotti sono vitali e fertili, come provato dal ritrovamento di reincroci già adulti. Precedenti studi hanno mostrato che le popolazioni di *S. a. ambrosii* dell'area de La Spezia analizzate mediante elettroforesi multilocus presentano degli alleli estranei alla specie e tipici sia di *S. italicus* sia di *S. strinati*. Perciò la verifica della possibilità di ibridazione tra *S. a. ambrosii* e *S. italicus* porta ad ipotizzare l'origine di questi alleli come paleointrogressione da *S. italicus* piuttosto che da *S. strinati*.

ALESSANDRA RUGGI*, ROBERTA CIMMARUTA*, GIANLUCA FORTI **
& GIUSEPPE NASCETTI*

PRELIMINARY STUDY OF A HYBRID ZONE BETWEEN
SPELEOMANTES ITALICUS (DUNN, 1923) AND
S. AMBROSII (LANZA, 1955) ON THE APUAN ALPS,
USING RFLP ANALYSIS

(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

In the last twenty years the study of hybrid zones has been increased and dealt successfully (ARNOLD 1992). Hybrid zones are “natural laboratories” to investigate the evolution of the reproductive isolation mechanisms in geographically isolated taxa that subsequently met and hybridized in a secondary contact (BARTON & HEWITT 1985; HARRISON 1990; HEWITT 1993). Since the glacial/interglacial stages, characterising the Quaternary epoch, have been relevant in determining isolation/secondary contact events, it has been hypothesized that the hybrid zones in the Alps and Pyrenees could have been formed during the last 9000 years (HEWITT 1988).

The DNA markers have been very useful in describing subspecific divergence and geographical species subdivision (AVISE 1998). In particular, mitochondrial DNA is suitable for studies concerning molecular evolution, hybrid zones, phylogeny and colonization events. This is due mainly to its molecular (WILSON *et alii* 1985) and inheritance properties (GYLLENSTEN *et alii* 1985; AVISE 1998). The rate of divergence of the mtDNA is 5-10 times faster than

* Dipartimento di Ecologia per lo Sviluppo Economico Sostenibile, Università della Tuscia, Via S. Giovanni Decollato 1, 01100 Viterbo, Italia;
e-mail: alessandra.ruggi@virgilio.it, cimmaruta@unitus.it & nascetti@unitus.it

** Museo del Fiore, Piazza G. Fabrizio 17, 01021 Acquapendente (VT), Italia;
e-mail: museo.fiore@tin.it

nuclear DNA (BROWN *et alii* 1979); it's fast enough to show population differences across a species range, and slow enough to skip saturation problems over a few million years. There is also a substantial difference in the evolutionary rates of mitochondrial DNA in different taxa (MORITZ *et alii* 1987). In the study of hybrid zones the mtDNA allows to investigate the direction of the gene flow and to verify if it is sex-biased or not (AVISE & SAUNDERS 1984; CARR *et alii* 1986; NELSON *et alii* 1987; SZYMURA *et alii* 1985; TAYLOR & HERBERT 1993), allowing ecological and ethological inferences. In the Plethodontid family a few hybrid zones have been investigated so far (HAIRSTON *et alii* 1992; YANEV 1980; WYNN 1986; WAKE *et alii* 1980; KARLIN & GUTTMANN 1981), and this is the only one found in the genus *Speleomantes*.

MATERIAL AND METHODS

Two hundred and five specimens were processed from 22 populations, collected between 1980 and 1993 (tab. 1, fig.1). Allozyme electrophoresis was used in a previous study to assess the genotype of each sampled individual (*S. italicus*, *S. a. bianchii* or introgressed) (CIMMARUTA 1993). From the same electrophoretically characterised specimens the total genomic DNA was extracted from frozen muscle tissue following the CTAB/phenol-chlorophorm protocol (MURRAY & THOMPSON 1980).

The double strand PCR amplification (SAIKI *et alii* 1988) was performed in a 50 µl volume containing: 5-20 ng of total purified genomic DNA; 2.5 u of Taq DNA polymerase, the primers (0.2 µM), MgCl₂ (2.5 mM), 1µl dNTP (0.2 mM). The amplification was carried out using GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), and began with an initial denaturation at 94°C for 5 minutes. Thermocycling parameters were: denaturation 94°C for 1', annealing at 45°C for 30'', extension at 72°C for 1', for 35 cycles. The reaction ended at 72°C for 10'. This yielded 501-bp-sized fragment, a part of the cytochrome-b region, corresponding to position 16,580 (5'end) and 17,078 (3'end) of *Xenopus laevis* (ROE *et alii.* 1985). The following primers were used for double strand PCR amplification: MVZ25-L (MORITZ *et alii.* 1992) modified into HY01 (5'-AAAGAAACTT-GAAATATTGGAGT-3') and MVZ16 (5' - AAATAGGAAWTAT-

CAYTCTGGTTTWAT- 3'), designed to match plethodontid salamanders (MORITZ *et alii* 1992).

Table 1 - Sampling list of populations, with the collection locality and province. The cadastral number of the caves is also reported, when available.

No.	Population name and locality	Abbreviation
1	Pulica (Tana della Bastiola 481T/MS), Massa Carrara	APU
2	Tana di Bedizzano (130T/MS), Massa Carrara	ABE
3	Forno (Buca della Renella 272T/MS and Buca della Cava dell'Onice 287T/MS), Massa Carrara	AFO
4	Near Porneta, Massa Carrara	APO
5	Pian della Fioba (botanic garden), Massa Carrara	APF
6	Near Galleria di Tecchia, Massa Carrara	ATE
7	Near Galleria Valsora, Massa Carrara	AVS
8	Near Galleria M.te Pelato, Lucca	AMP
9	Within Campagrina built up area, Lucca	ACM
10	Near Cave Henraux, Lucca	ACH
11	Near Isolasantà, Lucca	IIS
12	Near Arni, Lucca	AMU
13	Near Galleria del Cipollaio, Lucca	ICI
14	Near Vagli di Sotto, Lucca	IVA
15	Magnano (Tana del Pollone, no cadastral number), Lucca	IMN
16	Piteccio (Buca di Nadia 732T/PT, Buca di Anna 829T/PT, Buca delle Fate di Calabianna 830T/PT), Pistoia	IPT
17*	Calvana Mt. (Buca del Castagno 602T/FI), Florence	ICA*
18	Near Cardoso Stazzemese, Lucca	ICS
19	Borgo a Mozzano (G. della Cartiera 833T/LU), Lucca	IBM
20*	Near S.Giovanni in Petroio (Buca Ghiandaia 736T/FI, Buca delle fate di casa Ferrucci 192T/FI), Florence	IFI*
21	S. Martino in Freddana (Buca delle Fate 225T/LU), Lucca	ISM
22*	Buca Tana di Maggiano (827T/LU), Lucca	IMA*

* These samples have been studied using allozymes only, not RFLPs on mtDNA.

Sequencing was performed using A.B.I. Prisma 310 sequencer (Perkin Elmer) containing 2 μ l of ABI-mix for sequencing (Perkin Elmer), 1 μ l of primer (3.2 pmol) and about 50 ng of PCR product. The primers for sequencing were the same as PCR amplification.

Mitochondrial DNA (mtDNA) sequences of a double strand were checked using Chromas program version 1.6 (Technelysium Pty Ltd, 1998-2000) and aligned using the Clustal X program version 1.8 (THOMPSON *et alii* 1997). The suitable set of endonuclease enzymes providing specific haplotypes, was obtained using the program DNA for Windows version 2.2 (DIXON 1999). The chosen set of restriction enzymes is the following: HaeIII, SspI, RsaI, MboI. Enzymatic digestions were performed in a total volume of 10 μ l containing 7.5 μ l of the PCR product; 1 μ g of BSA and 5u of endonuclease. The digested DNA fragments were run on agarose 3% gel.

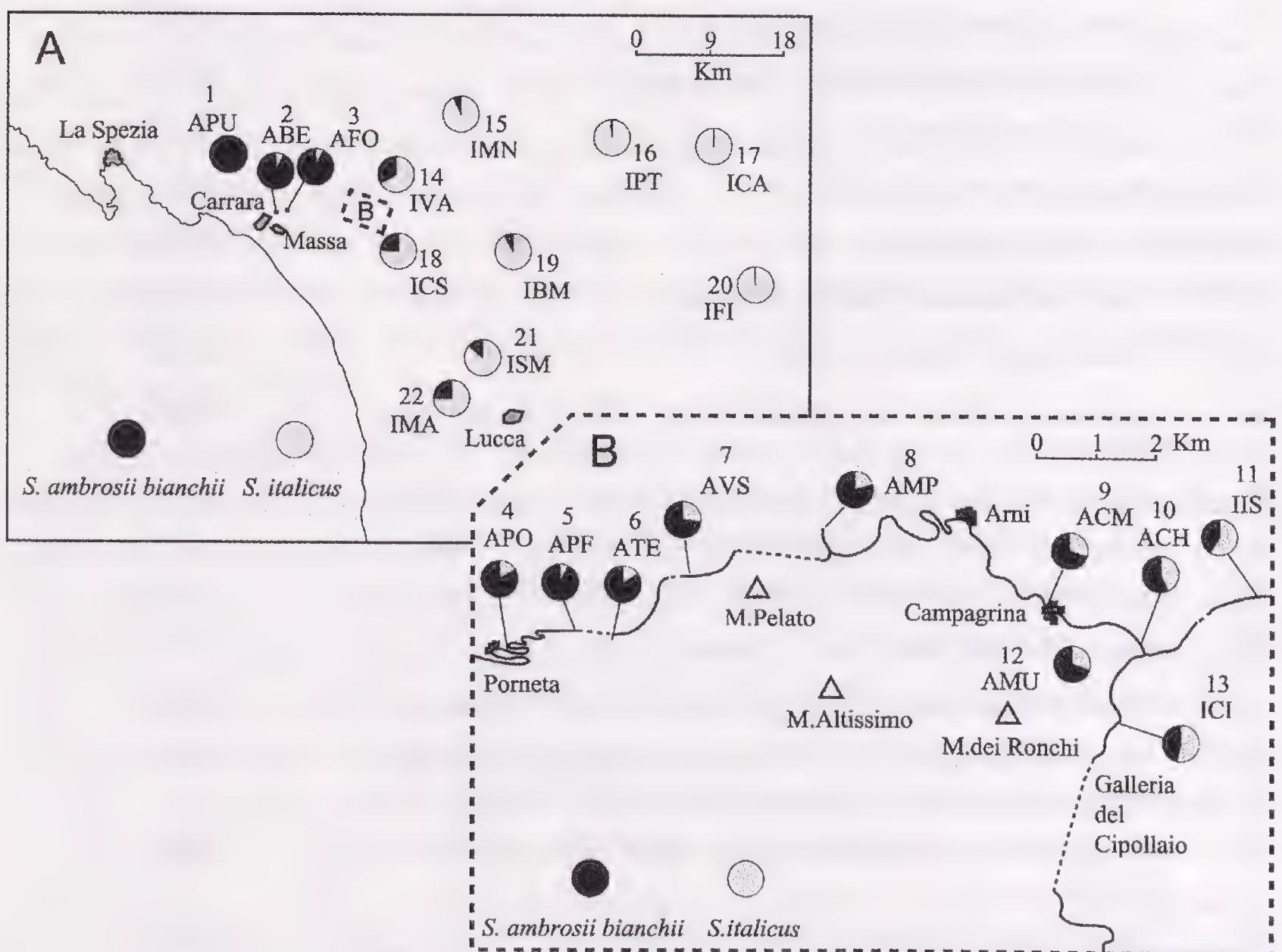


Fig. 1 - Mean allele frequencies of the samples of *S. a. bianchii* and *S. italicus*. B is the area of the contact zone enlarged (From CIMMARUTA 1993, modified).

Table 2 - Haplotypes observed in the studied taxa and in the samples from the contact zone (A1, AP1, AP2, H1). Different endonuclease digestion patterns referring to each enzyme are shown (A, B, C, D).

Restriction Enzyme	HaeIII	SspI	RsaI	MboI	Haplotype
<i>S. a. ambrosii</i>	B	B	B	B	A1
<i>S. a. bianchii</i> (Western populations)	B	C	A	A	AP1
<i>S. a. bianchii</i> (Eastern populations) and contact zone	B	D	A	B	AP2
<i>S. italicus</i> and contact zone	A	A	A	A	H1

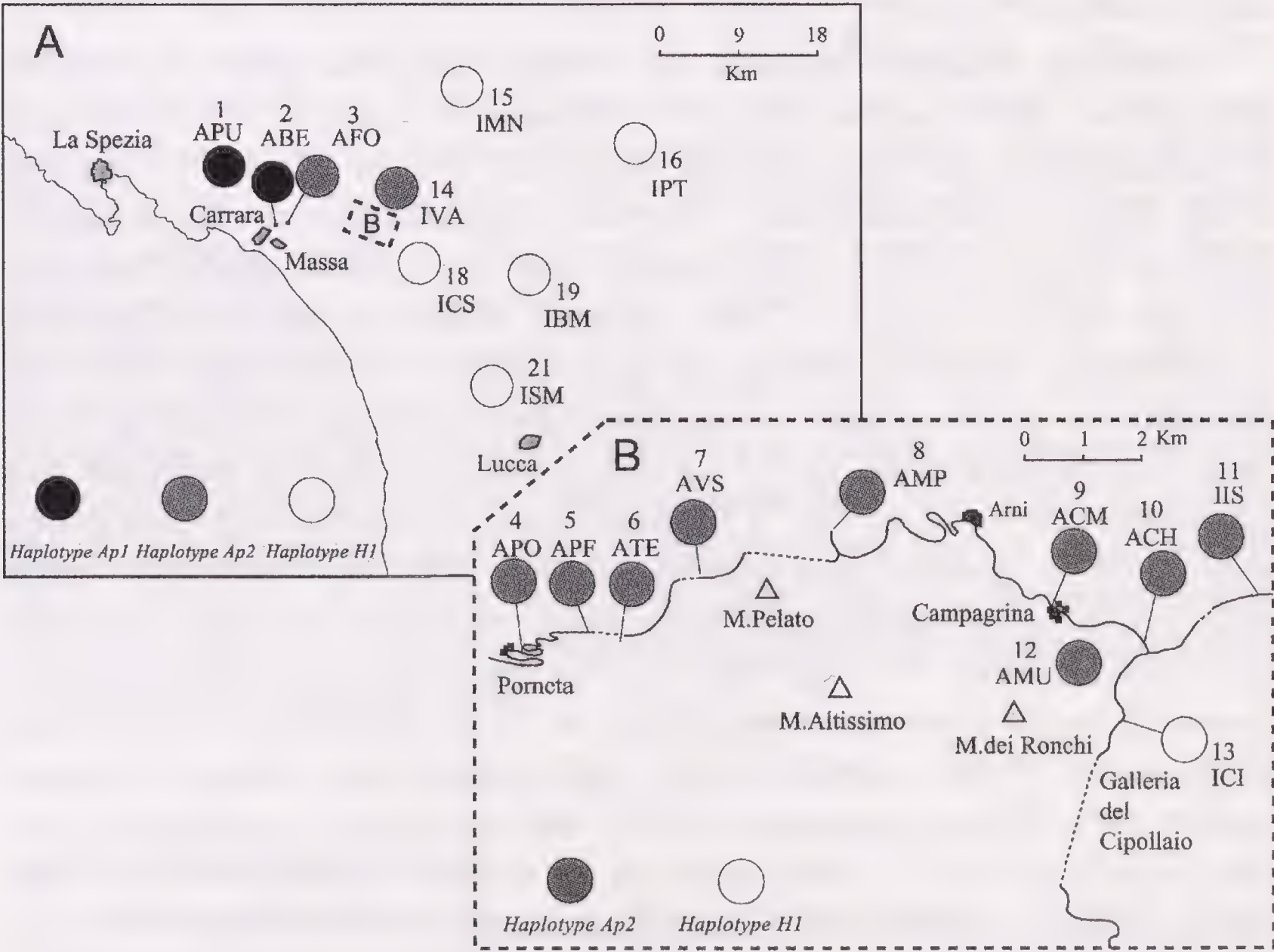


Fig. 2 - The haplotypes found in the studied samples of *S. a. bianchii* and *S. italicus* (A) and from the contact zone (B).

RESULTS

Full sequences of the cytochrome b 501-bp-sized fragment have been obtained from an overall number of 17 specimens of *S. a. ambrosii*, *S. a. bianchii*, *S. italicus* and from the contact zone. These sequences have been used to infer the restriction patterns and the corresponding haplotypes per each studied population (tab. 2).

The obtained haplotype frequencies per sample are shown in fig. 2. The observed pattern show that *S. a. bianchii* has two different haplotypes, observed in different populations. The two western populations, APU and ABE, have the same fixed haplotype (AP1), while the nearby sample from eastern population, AFO, is fixed for a different one (AP2). Interestingly, only this last haplotype (AP2) is hold by all the samples from the contact zone (n. 4-12 and n. 14; fig. 2). Southern populations have the *S. italicus* typical haplotype (H1) (n.13 and n. 15-16-18-19-21).

DISCUSSION

Previous studies, carried out using allozyme electrophoresis, have shown that the two taxa *S. a. bianchii* (LANZA *et alii* 2005) and *S. italicus* have met and hybridized in the Apuan Alps (CIMMARUTA 1993; NASCETTI *et alii* 1996). The two taxa have discriminant alleles fixed at 8 out of the 31 loci studied and their mean allele frequencies are shown in Fig. 1. The pattern observed for the allozymes is strikingly different respect to that obtained from mtDNA. The populations in the contact zone have alleles typical of both species, with frequencies close to 1:1 in many samples, as for example the populations n. 9-13 in the “Cipollaio” area where the two taxa probably came in contact and hybridized (fig. 1B). In the contact zone only recombinant genotypes have been recorded, without parental specimens neither F1 hybrids. On the contrary, the haplotype frequencies never show the coexistence of *S. a. bianchii* and *S. italicus* haplotypes: all the samples from the contact zone have the same haplotype (AP2) as population AFO. An exception is represented by the population n. 13 (ICI), having *S. italicus* haplotype (H1) (fig. 2B) in spite it is within the hybrid zone boundaries, as identified by allozyme markers. This shows another difference between nuclear and mitochondrial patterns: allozymes show an asymmetric intro-

gression, with *S. a. bianchii* alleles strongly entering into *S. italicus* gene pool, far away from the contact zone (fig. 1A), while mtDNA shows a clean-cut subdivision of the AP2/H1 haplotypes, both unable to cross the borderline represented by the “Cipollaio” area (fig. 2B).

Differences in the patterns of nuclear vs. mitochondrial markers are frequently observed in hybrid zones, due to their different features. In particular, being mtDNA maternally inherited, its distribution pattern is strongly dependent from sex-biased dispersal and is more subject to genetic drift effects, because of the smaller effective population size (one quarter of total N_e). These properties, together with the higher evolutionary rate of mtDNA respect to nuclear DNA, make mtDNA able to retain the marks of recent paleogeographic events and can explain the higher fragmentation observed within *S. a. bianchii* using mitochondrial markers: two different haplotypes characterise western (n. 1-2) vs. eastern (n. 3) populations, a difference not highlighted using allozymes.

In conclusion, the comparison of nuclear vs. mitochondrial markers suggested a biogeographic scenario originating the present pattern of hybridization between *S. a. bianchii* and *S. italicus*. The genetic subdivision of *S. a. bianchii* could be a legacy of ice ages, that fragmented *Speleomantes* populations in many refugia (FORTI *et alii* 1998; CIMMARUTA *et alii* 2005). Mitochondrial genes could retain stronger signs of this recent history because of their above mentioned features, indicating the existence of more than a single remnant nucleus in the Apuan Alps, as suggested by the presence of two different haplotypes (AP1/AP2) in the area. The further expansion during interglacials could have leaded to the meeting of specimens bearing western-*bianchii* haplotype (AP2) with *S. italicus* (H1). The hybridization occurred was probably due to *S. a. bianchii* males entering *S. italicus* range, as suggested by the presence of *bianchii* nuclear genes into *S. italicus* populations not having *bianchii* mtDNA in their gene pool.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the personnel of the Botanic Garden “Pian della Fioba” for their kind help during the sampling sessions in the contact zone. We are particularly indebted to Prof. L. Bullini for his supervision of the allozyme work carried out.

REFERENCES

- ARNOLD M.L., 1992 - Natural hybridization as an evolutionary process - *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, Palo Alto, 23: 237-261.
- AVISE J.C., 1998 - The history and purview of phylogeography: a personal reflection - *Mol. Ecol.*, Oxford, 7: 371-379.
- AVISE J.C. & SAUNDERS N.C., 1984 - Hybridation and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers - *Genetics*, Bethesda, 108: 237-255.
- BARTON N.H. & HEWITT G.M., 1985 - Analysis of hybrid zones - *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, Palo Alto, 16: 113-148.
- BROWN W.M., GEORGE M. JR. & WILLIAM A.C., 1979 - Rapid evolution of animal mitochondrial DNA - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 76: 1967-1971.
- CARR S.M., BALLINGER S.W., DERR L.N., BLANKENSHIP L.H. & BICKHAM L.W., 1986 - Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in West Texas - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 83: 9576-9580.
- CIMMARUTA R. 1993 - Ricerche di ecologia genetica ed evolutiva in Pletodontidi del genere *Speleomantes* (Amphibia: Plethodontidae) - Tesi di Dottorato di Ricerca in Ecologia, V Ciclo, Università degli Studi di Parma, Anno Accad. 1992-93, 130 pp.
- CIMMARUTA R., FORTI G., LANZA B. & NASCETTI G., 2005 - The effects of Quaternary glaciations on the genetic structure of *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) (Amphibia, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 97: 109-121.
- DIXON D., 1999 - A small but powerful DNA sequence editing and analysis program for Windows 95/98/NT - free download available at <http://website.lineone.net/~molbio/>
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Glaciazioni del Quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 197-211.
- GYLLENSTEN U., WHARTON D. & WILSON A.C., 1985 - Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice - *J. Hered.*, New York, 76: 321-324.
- HAIRSTON N.G., WILEY R.H., SMITH C.K. & KNEIDEL K.A., 1992 - The dynamics of two hybrid zones in Appalachian salamanders of the genus *Plethodon* - *Evolution*, Lancaster, 46: 930-938.
- HARRISON R. G., 1990 - Hybrid zones: windows on evolutionary process - *Oxford Surv. Evol. Biol.*, 7: 69-128.
- HEWITT G.M., 1988 - Hybrid zones: natural laboratories for evolutionary studies - *Trends Ecol. Evol.*, Amsterdam, 3: 158-167.
- HEWITT G.M., 1993 - After ice age: *parallelus* meet *erythropus* in the Pyrenees (pp. 140-164) - In: R.G. HARRISON (Ed.), Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, Oxford, 376 pp.
- KARLIN A.A. & GUTTMAN S.I., 1981 - Hybridization beetwen *Desmognatus fuscus* and *Desmognatus ochrophaeus* (Amphibia : Urodela: Plethodontidae) in northeastern Ohio and northwestern Pennsylvania - *Copeia*, Lawrence, 1981: 371-377.

- LANZA B., CIMMARUTA R., FORTI G., BULLINI L. & NASCETTI G., 2005 - Bianchi's cave salamander, *Speleomantes ambrosii bianchii* n. ssp. (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 97: 59-77.
- MORITZ C., DOELING T.E. & BROWN W.M., 1987 - Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics - *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, Palo Alto, 18: 269-292.
- MORITZ C., SCHNEIDER C.J. & WAKE D.B., 1992 - Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation - *System. Biol.*, Washington, 41: 273-291.
- MURRAY M.G. & THOMPSON W.F., 1980 - Rapid isolation of high molecular weight plant DNA - *Nucleic Acids Res.*, London, 8: 4321-4325.
- NASCETTI G., CIMMARUTA R., LANZA B. & BULLINI L., 1996 - Molecular taxonomy of European plethodontid salamanders (Genus *Hydromantes*) - *J. Herpet.*, Athens, 30 (2): 161-183.
- NELSON K., BAKER J.R. & HONEYCUTT R.L., 1987 - Mitochondrial DNA and protein differentiation between hybridizing cytotypes of the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus* - *Evolution*, Lancaster, 41: 864-872.
- ROE B.A., MA D.P., WILSON R.K. & WONG J.F., 1985 - The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial DNA genome - *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 260: 9759-9774.
- SAIKI R., DELFAND D.H., STOOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. & ERLICH H.A., 1988 - Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase - *Science*, Washington, 239: 487-491.
- SZYMURA J. M., SPOLSKY C. & UZZELL T., 1985 - Concordant change in mitochondrial and nuclear genes in the hybrid zone between two frog species (genus *Bombina*) - *Experientia*, Basel, 41: 1496-1470.
- TAYLOR D.J. & HEBERT P.D.M., 1993 - Habitat-dependent hybrid parentage and differential introgression between neighboringly sympatric *Daphnia* species - *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 90: 7079-7083.
- TECHNELYSIUM PTY LTD, COPYRIGHT 1998-2000 - Free download at internet site: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F. & HIGGINS D.G., 1997 - The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools - *Nucleic Acids Res.*, London, 24: 4876-4882.
- WAKE D.B., YANG S.Y. & PAPENFUSS T.J., 1980 - Natural hybridization and its evolutionary implications in Guatemala Plethodontid salamanders of the genus *Bolitoglossa* - *Herpetologica*, Pittsburgh, 36: 335-345.
- WILSON A.C., CANN R.L., CARR S.M., GEORGE M. JR. & GYLLENSTEN U.B., 1985 - Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics - *Biol. J. Linn. Soc.*, London, 26: 375-400.
- WYNN A.H., 1986 - Linkage disequilibrium and a contact zone in *Plethodon cinereus* on the Del Mar Va Peninsula - *Evolution*, Lancaster, 40: 44-54.
- YANEV K.P., 1980 - Biogeography and distribution of three parapatric salamander species in coastal and borderland California (pp. 531-550) - In: POWER D.M. (Ed.) *The California islands: Proceedings of a multidisciplinary symposium*. Santa Barbara Mus. Nat. Hist., 787 pp.

ABSTRACT

It has been recently demonstrated that the species *Speleomantes ambrosii* includes two geographically and genetically distinct forms: *S. ambrosii ambrosii*, from the area of La Spezia on the hydrographic right side of the Magra river, and *S. ambrosii bianchii*, ranging from Massa Carrara to the west side of the Apuan Alps. In this area *S. a. bianchii* and *S. italicus* came in contact and hybridized, as shown by previous allozyme analysis.

Within this study a RFLP protocol has been set up to investigate the mitochondrial genome of *Speleomantes* species. The fragment amplified is 501-bp-sized of Cytochrome b region. The specific haplotypes characterising the taxa *S. italicus*, *S. a. ambrosii* and *S. a. bianchii* have been obtained using a set of four restriction enzymes. The haplotypic pattern evidenced is not coincident with the allozyme one, showing a high genetic fragmentation of *S. a. bianchii* and a segregation of *bianchii-italicus* haplotypes in the contact zone.

RIASSUNTO

Studio preliminare di una zona di ibridazione tra *Speleomantes italicus* e *S. ambrosii* sulle Alpi Apuane, utilizzando l'analisi RFLP (Amphibia, Plethodontidae).

La specie *Speleomantes ambrosii* presenta due forme geneticamente differenziate: *S. ambrosii ambrosii*, in provincia di La Spezia, alla destra idrografica del fiume Magra, e *S. ambrosii bianchii* in provincia di Massa Carrara fino al versante occidentale delle Alpi Apuane, dove quest'ultimo è venuto in contatto ed ha ibridato con *S. italicus*. In questo studio preliminare è stata messa a punto la tecnica RFLP su DNA mitocondriale di *Speleomantes* e si è analizzata una porzione di mtDNA di 501 bp codificante per il Citocromo b. Sono stati individuati gli aplotipi caratteristici di *S. italicus*, *S. a. ambrosii* e *S. a. bianchii*.

I risultati ottenuti mostrano un pattern aplotipico non coincidente con quello allozimico, ottenuto in studi precedenti. Il confronto fra le due serie di dati ha permesso di evidenziare una considerevole frammentazione genetica di *S. a. bianchii* e la separazione degli aplotipi di *S. a. bianchii* e *S. italicus*, che non sono mai presenti contemporaneamente nella stessa popolazione.

SANDRO CASALI*, ANDREA SUZZI VALLI*, GLAUCO BUSIGNANI*
& GIANCARLO TEDALDI**

I COSTUMI ARBORICOLI DI *SPELEOMANTES ITALICUS* (DUNN, 1923) NELLA REPUBBLICA DI SAN MARINO

(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUZIONE

Nella Repubblica di San Marino *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) risulta diffuso tra i 300 e i 650 m s.l.m. in aree a prevalente substrato calcareo, mentre in zone limitrofe esso è stato rinvenuto anche a quote decisamente inferiori (e superiori) e in cavità della locale formazione gessosa (BAGLI 2001; GUIDUCCI *s.d.*; LANDI 2000; PASTORELLI *et alii* 2001; TEDALDI 1996; TEDALDI & LAGHI 1998).

Nel territorio sammarinese il geotritone italico è noto per diverse località (LANZA 1955; SUZZI VALLI 1993) e risulta particolarmente comune e facilmente osservabile anche in ambienti aperti ed in situazioni apparentemente insolite: in qualsiasi periodo dell'anno, infatti, quando le condizioni atmosferiche non costituiscono un fattore limitante, lo si può reperire anche sui muri e sulle gradinate della città. Più volte è stato sorpreso in cantine ed in altre parti di edifici ricavati direttamente nella roccia ed è stato anche intercettato mentre compiva spostamenti lungo le vie e addirittura su strade asfaltate. In ambiente epigeo frequenta le pareti rocciose e si rinviene sovente tra le pietre poste in prossimità di rupi.

Il presente contributo costituisce un approfondimento dello studio preliminare condotto nella Repubblica di San Marino a

* Centro Naturalistico Sammarinese, Via Valdes De Carli 21, 47893 Borgo Maggiore, Repubblica di San Marino; e-mail: centronaturalistico@omniway.sm

** Riserva Naturale Orientata Bosco di Scardavilla, Piazza F. Orsini 29, 47014 Meldola (FC), Italia; e-mail: scardavilla@comune.meldola.fo.it

seguito delle osservazioni sulle “inconsuete” abitudini arboricole del geotritone italico (CASALI *et alii* 2002).

MATERIALI E METODI

L'area di studio è localizzata in una località mai segnalata in precedenza posta tra Borgo Maggiore (RSM) e San Marino, a circa 550 m s.l.m., in ambiente fresco ed ombreggiato con esposizione nord. La vegetazione è di tipo mesofilo e si compone di un bosco misto di latifoglie con dominanza di Carpino nero (*Ostrya carpinifolia*), Orniello (*Fraxinus ornus*) ed aceri (*Acer sp.*); lo strato arbustivo è rado, mentre quello erbaceo è a copertura diffusa e ricco di specie (fig. 1). Al fine di procedere ad un'analisi più dettagliata del fenomeno è stata individuata una superficie di studio “ridotta” (pari a circa 600 mq) comprendente una imponente emergenza rocciosa e diversi alberi di specie e dimensioni variabili (tab. 1).



Fig. 1 - Ambiente in cui sono state effettuate le osservazioni di geotritone.

Le osservazioni sono state effettuate in giorni con differenti condizioni meteorologiche e sempre in ore notturne (fig. 2). Per

l'attribuzione alle classi di età "adulti" (e quindi esemplari sessualmente maturi) e "subadulti" o immaturi è stato utilizzato il lavoro di PASTORELLI *et alii* (2001) che fissano nella lunghezza muso-cloaca di 42 mm la presumibile forbice di separazione tra gli individui maturi e quelli immaturi. Per la distinzione tra maschi e femmine si è considerata la presenza/assenza della ghiandola mentoniera, facilmente rilevabile nei maschi adulti.

Tab. 1 - Caratteristiche degli esemplari arborei e numero di osservazioni di geotritone effettuate nell'area di studio.

Pianta	Specie	Diametro (cm)	N. osservazioni di geotritone
1	orniello	75	30
2	orniello	35	11
3	acero	55	28
4	robinia	28	13
5	robinia	25	18
6	orniello	65	25
7	robinia	26	17
8	acero	7	5
9	orniello	42	16
10	acero	68	16
11	orniello	12	3
12	robinia	20	2

RISULTATI E CONCLUSIONI

Delle 240 osservazioni di geotritone effettuate nell'area indagata, 184 (77%) riguardavano individui localizzati su tronchi di piante vive e 56 (23%) individui rinvenuti a terra o su roccia. Al di fuori dell'area di studio, 6 esemplari sono stati osservati anche su pali in ferro a sostegno di reti paramassi. Di giorno, entro l'area è stato rinvenuto un solo esemplare sotto un tronco marcescente, al di fuori due esemplari fra le rocce e seminascosti fra muschi e felci.

I dati relativi al numero e alla localizzazione delle osservazioni e la struttura della popolazione esaminata durante lo studio sono riportati nella tab. 2.


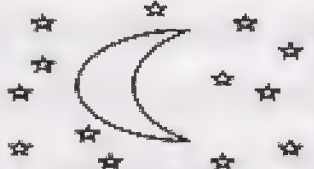



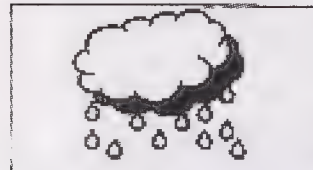
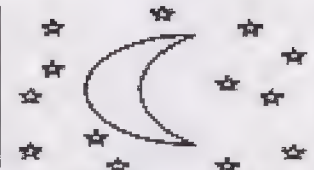
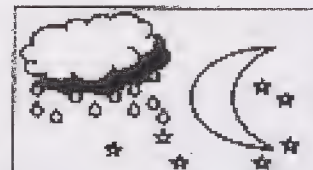
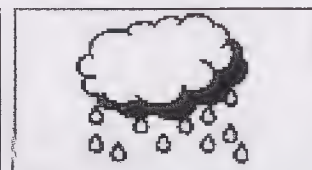

				
10/10/01 0.30-2.30 + 15 °C dopo pioggia, sereno, nebbia Tot. esemplari 39 Su piante 24 A terra o su roccia 15 Maschi 13 Femmine 20 Subadulti 6	17/10/01 23.10-0.50 + 13 °C sereno Tot. esemplari 9 Su piante 8 A terra o su roccia 1 Maschi 4 Femmine 5 Subadulti 0	24/10/01 23.45-2.00 + 12 °C dopo pioggia, sereno, nebbia Tot. esemplari 60 Su piante 41 A terra o su roccia 19 Maschi 20 Femmine 25 Subadulti 15	10/11/01 23.45-0.15 + 3 °C pioggia Tot. esemplari 4 Su piante 4 A terra o su roccia 0 Maschi 1 Femmine 3 Subadulti 0	06/04/02 23.30-0.30 + 10 °C pioggia dopo lungo per. secco Tot. esemplari 0 Su piante 0 A terra o su roccia 0 Maschi 0 Femmine 0 Subadulti 0
				
08/04/02 23.15-2.15 + 7 °C pioggia Tot. esemplari 61 Su piante 51 A terra o su roccia 10 Maschi 21 Femmine 31 Subadulti 9	14/04/02 22.45-0.45 + 6 °C sereno Tot. esemplari 14 Su piante 11 A terra o su roccia 3 Maschi 8 Femmine 6 Subadulti 0	27/04/02 23.30-1.30 + 8 °C dopo pioggia, sereno, nebbia Tot. esemplari 46 Su piante 38 A terra o su roccia 8 Maschi 20 Femmine 20 Subadulti 6	10/08/02 0.30-1.30 + 16 °C pioggia Tot. esemplari 7 Su piante 7 A terra o su roccia 0 Maschi 1 Femmine 5 Subadulti 1	22/08/02 0.00-0.30 + 19 °C dopo pioggia, sereno, nebbia Tot. esemplari 0 Su piante 0 A terra o su roccia 0 Maschi 0 Femmine 0 Subadulti 0

Fig. 2 - Date, condizioni meteorologiche e numero di geotritoni osservati.

Tab. 2 - Numero di osservazioni di geotritone ripartite in base al sesso, alle dimensioni e al tipo di substrato di rinvenimento.

	N. osservazioni totali	N. osservazioni su specie arboree	N. osservazioni a terra o su roccia
maschi	88	65	23
femmine	115	91	24
totale adulti	203	156	47
subadulti	37	28	9
totale esemplari	240	184	56

I geotritoni sono stati trovati su varie specie arboree (tab. 1) e la loro distribuzione sui tronchi era concentrata entro i primi 90 cm di altezza da terra, con un numero decrescente di osservazioni ad altezze superiori. L'altezza massima di rinvenimento è stata di poco superiore ai 350 cm (fig. 3).

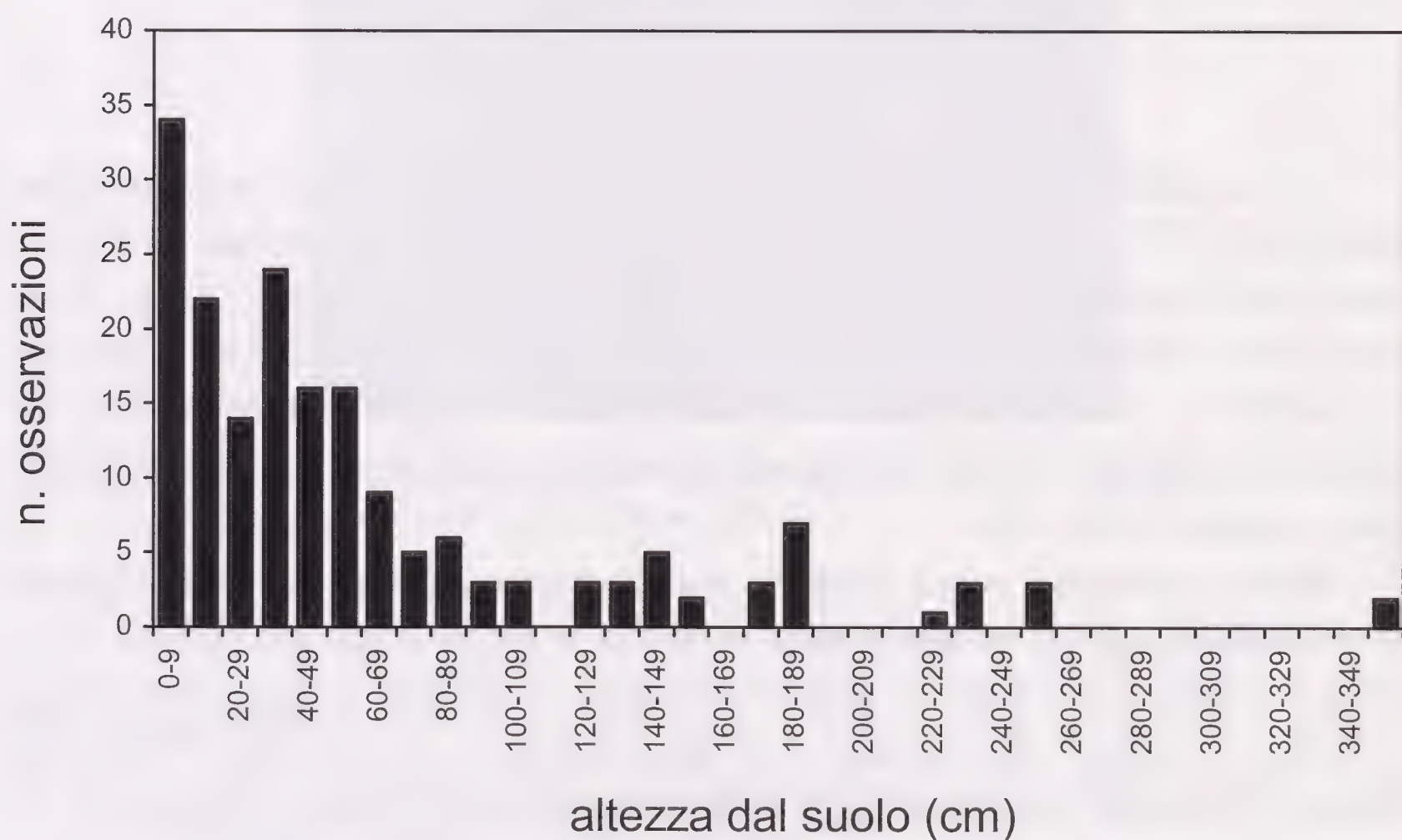


Fig. 3 - Distribuzione altitudinale degli esemplari di geotritone lungo i tronchi degli alberi.

In due occasioni è stato verificato che la maggior parte dei geotritoni iniziava a risalire lungo i tronchi verso le 23 e che quasi tutti stazionavano ad altezze diverse per alcune ore (fig. 4).



Fig. 4 - Esemplare di *Speleomantes italicus* in risalita e in sosta su un tronco.

In condizioni meteorologiche sfavorevoli (notti con temperature inferiori a 3°C o superiori a 16°C), i pochi animali osservati si trovavano sui tronchi e nessuno è stato osservato a terra o su rocce. Non sono state rilevate differenze significative nel rapporto tra i sessi e fra adulti e subadulti presenti sui tronchi e quelli a terra e/o su roccia; in queste fasi della ricerca non sono stati mai osservati esemplari neonati (tab. 2).

Sulla corteccia e fra l'edera sono state osservate diverse specie di artropodi, quasi sempre ben in vista e facilmente predabili; l'attività trofica potrebbe in parte spiegare l'attività arboricola, come in effetti è stato dimostrato nel pletodontide americano *Plethodon cinereus* (Green) da JAEGER (1978). Sui tronchi alcuni esemplari di sesso diverso sostavano molto vicini, altri apparentemente si seguivano camminando (fig. 5). Nessun esemplare è stato però sorpreso in attività di corteggiamento, forse a causa del disturbo provocato dal fascio luminoso della torcia.

Le osservazioni condotte accertano un fenomeno sicuramente rilevante sotto il profilo ecologico e comportamentale; infatti il numero dei geotritoni osservati in attività sui fusti delle piante era

molto più elevato di quello degli esemplari presenti a terra e ciò suggerisce che quanto osservato non può essere un fenomeno casuale.



Fig. 5 - Due esemplari di *Speleomantes italicus* di sesso opposto che apparentemente “interagiscono” sul tronco di un albero.

BIBLIOGRAFIA

- BAGLI L., 2001 - Segnalazioni faunistiche n° 43: *Speleomantes italicus* - *Quad. Studi nat. Romagna*, Cesena, 14: 128.
- GUIDUCCI P., s.d. - Grotte e luoghi sotterranei - Provincia di Rimini, Rimini: 27-28.
- JAEGER R.G., 1978 - Plant climbing by salamanders: periodic availability of plant dwelling prey - *Copeia*, Lawrence, 1978: 686-691.
- LANDI L., 2000 - Segnalazioni faunistiche n° 40: *Speleomantes italicus* - *Quad. Studi nat. Romagna*, Cesena, 13: 72.
- LANZA B., 1955 - Notizie sulla distribuzione in Italia del Geotritone (*Hydromantes italicus* Dunn) e descrizione di una nuova razza (Amphibia Plethodontidae) - *Arch. zool. ital.*, Napoli, 39 (1954): 147-162.

- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2001 - Studi preliminari sull'ecologia di *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) nell'Appennino tosco romagnolo (Caudata: Plethodontidae) - *Pianura*, Cremona, 13: 347-351.
- SOCIETAS HERPETOLOGICA ITALICA, 1996 - Atlante provvisorio degli Anfibi e dei Rettili italiani - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 91: 95-178.
- SUZZI VALLI A., 1993 - Repubblica di S. Marino. Ambiente e Aree tutelate - Ed. Dicastero al Territorio e Ambiente AIEP, San Marino, 211 pp.
- TEDALDI G., 1998 - Guida agli Anfibi e ai Rettili della Romagna - Ed. Maggioli, Rimini, 94 pp.
- TEDALDI G. & LAGHI P., 1998 - Il Progetto Atlante Erpetologico della Provincia di Forlì-Cesena: resoconto dopo i primi cinque anni di attività: primo contributo (Amphibia, Urodela, Anura) - *Quad. Studi nat. Romagna*, Cesena, 10: 33-45.

RIASSUNTO

Nella Repubblica di San Marino il geotritone *Speleomantes italicus*, noto per diverse località, risulta particolarmente comune e facilmente osservabile, con condizioni atmosferiche favorevoli, anche in ambienti aperti ed in città. Recentemente sono state compiute osservazioni sistematiche autunnali e primaverili su un cospicuo numero di esemplari con costumi arboricoli i quali risalgono i fusti degli alberi e vi stazionano per alcune ore, posizionandosi ad altezze differenti e senza una apparente discriminazione nella scelta della specie vegetale, del suo diametro e della scabrosità del tronco.

Nonostante il numero totale di esemplari rilevati comprenda catture ed eventuali ricatture, risulta che le osservazioni di esemplari in attività sui tronchi degli alberi sono state circa il triplo di quelle effettuate sul terreno, suggerendo che il fenomeno non può essere riferito al caso; si ipotizza quindi che tale comportamento sia legato ad una maggior disponibilità di prede.

ABSTRACT

Arboreal customs of *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) in the Republic of San Marino (Amphibia, Plethodontidae).

In the Republic of S. Marino, the Italian Cave Salamander *Speleomantes italicus* is common and widespread. During favourable weather conditions, the Italian Cave Salamander is commonly observed, even in rather unusual sites such as on stony walls, stone stairs and balconies within the city and in cellars or other parts of buildings that are constructed directly upon the rock. Recently, repetitive observations have been made on a conspicuous number of tree climbing specimens. During the night, salamanders climb and stay upon tree trunks for several hours, without any preference for the tree species, tree diameter or trunk roughness.

These observations took place during several nights both in autumn and spring and confirm that plant climbing is a relevant activity in the studied population, suggesting that this behaviour is probably related to feeding upon arboreal invertebrates.

PAOLO LAGHI*, CHRISTIAN PASTORELLI**
& DINO SCARAVELLI***

INDIVIDUAL PATTERN RECOGNITION OF
SPELEOMANTES ITALICUS (DUNN, 1923)

(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

Individual recognition of the animals by means of marking is one of the bases of most ecological studies. The marking of amphibians is especially difficult, problems arising from the often small size of the animals and their peculiar skin morphology and physiology; the several techniques that have been so far proposed have both advantages and limits, which should be carefully taken into account according to investigation's aims (cf. FABER, 2001). Toe-clipping is still among the most commonly employed techniques, although it cannot be used in long-term researches on tailed amphibians, because of their high regeneration potential (about regeneration in *Speleomantes*, cf. SALVIDIO, 1997). Furthermore, the resulting injuries may increase the risk of mortality or affect animals fitness.

Pattern recognition is also among the most considerate methods for amphibians (especially Caudata), which effectiveness is comparable to that of other techniques, such as toe clipping and application of P.I.T. (Passive Integrated Transponders) (cf. FABER, 2001). This technique was first applied to *Speleomantes* by SALVIDIO *et alii* (1994), who used backlimb colour pattern to individually recognize *S. stri-natii* (Aellen, 1958); herein we reports the results coming from pattern recognition of *S. italicus* (Dunn, 1923) over two consecutive years.

* Via Bruno Costante Garibaldi 22, 47100 Forlì, Italia; e-mail: spelerpes@libero.it

** Via Cerchia di Sant'Egidio 2205, 47023 Cesena (FC), Italia;
e-mail: pastorellic@libero.it

*** Associazione Chiroptera Italica, Via Veclezio 10/A, 47100 Forlì (FC), Italia;
e-mail: dinosc@tin.it

MATERIALS AND METHODS

The study site is a tectonic cave called «Grotta del Tritone», located in northern Apennines (province of Forlì-Cesena, Italy).

The *S. italicus* population gravitating around the cave has been object of a long term study, in order to investigate several natural history traits of the species (cf. PASTORELLI *et alii* 2001, 2002a, 2002b and 2005).

The site was visited monthly from September 1998 to August 2000 (except for October 1998); all cave salamanders captured were measured and sexed by means of exterior sexual characters. Dorsal pattern was photographed under near-freezing water, in order to avoid reflections in images (cf. LANZA *et alii* 1995) and to speed up animal's immobilization; a transparent millimetered paper sheet laying on tank bottom provided an additional reference as regards to salamanders size.

Images were taken by a reflex camera 35 mm, equipped with a 100 ASA color slide film, and a flash-lamp. Date of capture, sex, body length (from snout tip to the anterior end of the vent), and identification code of each animal were recorded and stored up in a digital data bank. At the end of all sample sessions each salamander was released in the place where it was captured. Later, in the laboratory, for each specimen an identification mark was chosen: a single blotch, a group formed by few blotches, or an area lacking ochra-reddish pigments; then, individual recognition occurred by means of direct slide comparison.

RESULTS AND DISCUSSION

The studied population shows “*italicus*”-type colour and patterns, as described by LANZA *et alii* (1995): dorsal pattern with brown ground colour abundant and sometimes prevailing; ochra-reddish blotchings and/or marblings on the trunk and tail; pattern reduced or lacking on the head and neck, often more and more widespread towards the tail, where light markings usually overwhelm the darker ground colour (fig. 1); ventral pattern with dark ground colour (nut-brown to dark bistre) dusted or closely dotted with white or off-white.

Because of its wider range of colours and higher complexity, dorsal pattern was chosen instead of ventral one in order to recognize animals.

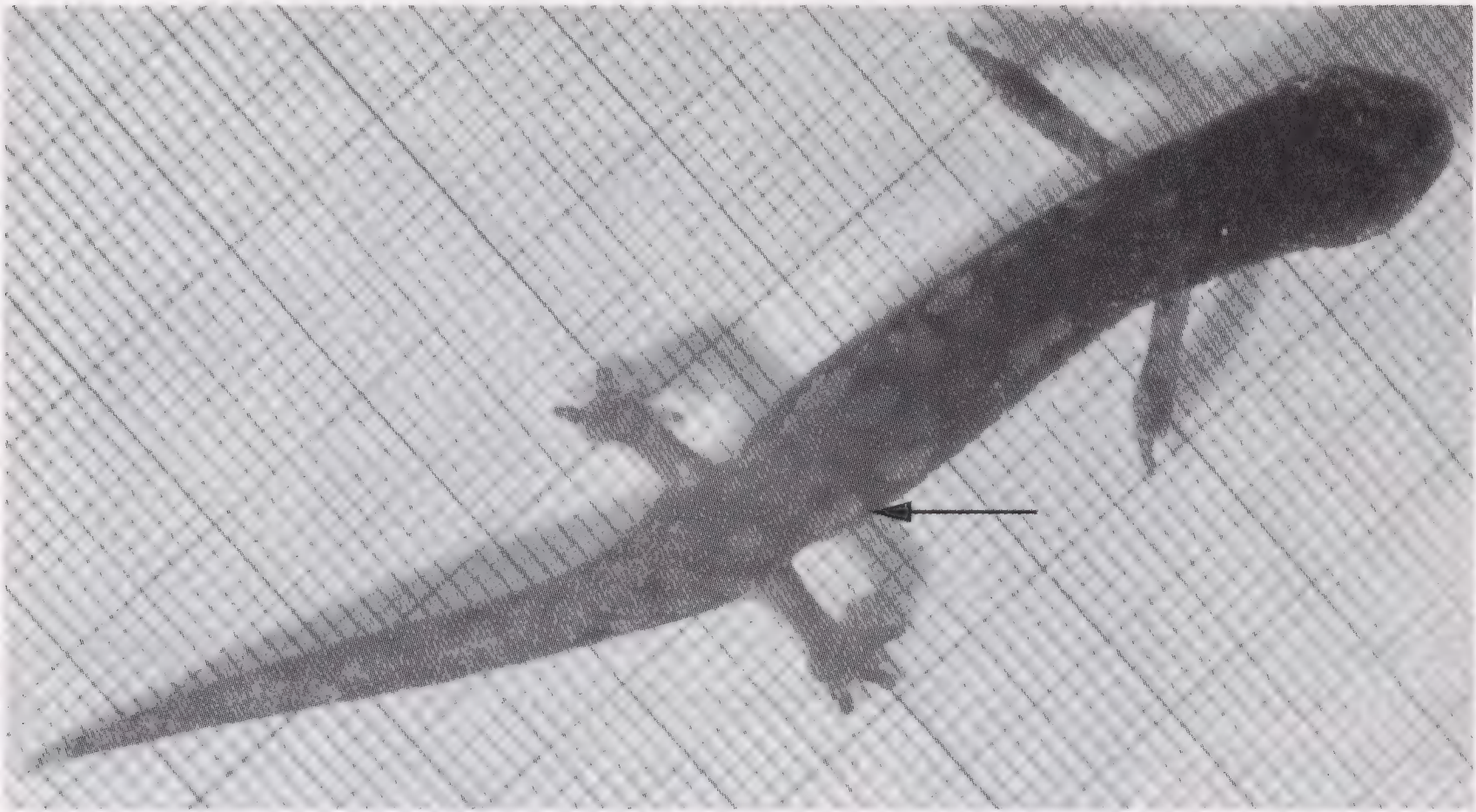


Fig. 1 - Example of *S. italicus* «mug shot». Male, «blotched» phenotype. The arrow indicates the «C» shaped blotch used as identification mark.

According to LANZA *et alii* (1995) dorsal pattern of *Speleomantes* is highly variable also within the same population. We arbitrarily recognized three main «pattern phenotypes» within the studied population [percentages of each phenotypes within a section of the sample (n = 96) have been cited in round brackets]:

- 1) «juvenile» (26.0%): dark ground colour prevailing, with only few, almost reddish or rarely ochra, dustings and speckles;
- 2) «blotched» (52.1%): ochra-reddish chromatophores arranged in quite defined blotches, variable in size and shape, pattern roughly corresponding to «*italicus*»-type described by LANZA *et alii* (1995);
- 3) «marbled» (21.9%): ochra-reddish chromatophores arranged in marblings, an intermediate pattern between «*reticulate*»-type and «*gormanii*»-type of LANZA *et alii* (1995).

The frequency of phenotypes in the different sex categories is reported in tab. 1.

Tab. 1 - Percentages of each phenotype in the different sex categories, calculated for a section of the sample (n = 96).

Phenotype	Immatures	Males	Females
Juvenile	68.6	4.0	0.0
Blotched	25.7	76.0	61.1
Marbled	5.7	20.0	38.9
n	35	25	36

An identification mark should be easy recognizable, and durable. In order to match these conditions we chose blotches characterized by a relatively big size (less affected than speckles by pattern variations caused by age), a peculiar shape and a good contrast against the ground colour (allowing a quick spotting), and a middorsal position on animal's back (always noticeable in images, while blotches on sides may not be visible due to animal's torsion or inclination). Such blotches are more often found from the posterior half of salamander's trunk to the tail (86.5% of cases, in a sample section of 96 specimens), thus this is the body region on which attention should be focused for individual cave salamanders recognition.

Individual dorsal pattern also changes gradually with age. As already written, most of juvenile salamanders (15-28 mm in body length) display a pattern characterized by few reddish dustings and speckles on the darker ground colour. As the animal grows, due to the addition of ochra-reddish chromatophores, the small spots increase and sometimes merge into others to form larger blotches (fig. 2), the pattern turning gradually into «blotched» or «marbled» phenotypes.

Over the study period we were able to recognize 243 specimens: 118 adults (60 males and 58 females) and 125 immatures. 96 specimens were captured more than once (up to 8 times) and it was possible to recognize salamanders even two years after their first capture. As all the salamanders were collected within an area of 300 m², the extrapolated density is 0.8 individuals/m², that is exactly the same mean value estimated by SALVIDIO (1998) for *S. strinatii* sampled on a rock-face habitat. Quite lower density values were obtained for *S. supramontis* by VOESENEK *et alii* (1987: 300 animals/ha) and for *S. strinatii* by CORTESOGNO & BALLETO (1989: 0.1 individuals/m²),

who sampled respectively in a dense holm oak forest and in a seepage area located in a beech forest.

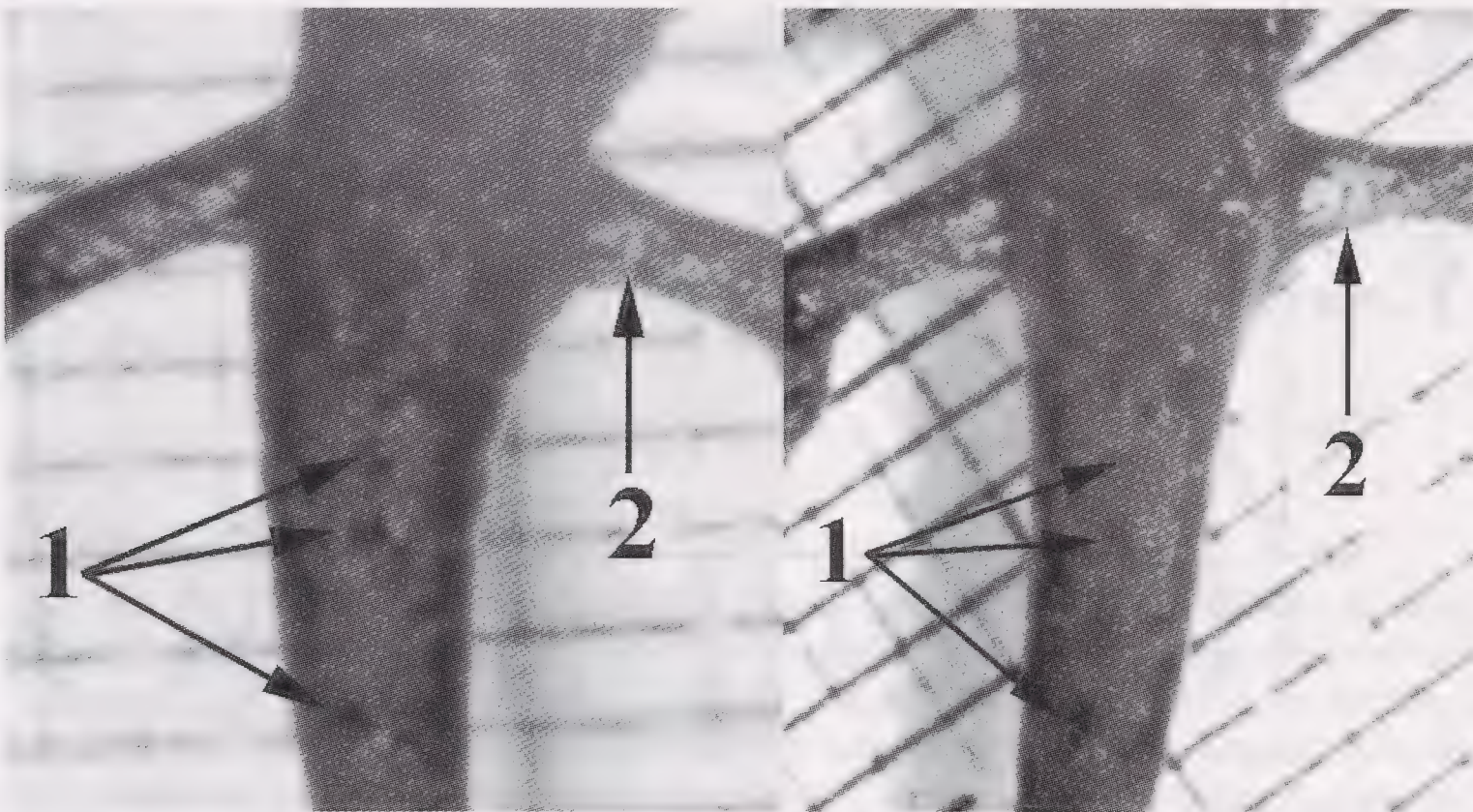


Fig. 2 - *S. italicus* pattern variations caused by age. Immature, «juvenile» phenotype. The arrows indicate areas with visible ground colour, that were progressively filled with reddish chromatophores (1), and the growth of a blotch, due to the appearance of new ochra chromatophores (2). Left = date of capture: May 17th 1999; body length = 16 mm. Right = date of capture: February 2nd 2000; body length = 24 mm.

Recapture rate (calculated for each sample session as % of known specimens on the total number of salamanders captured) averaged 48.8%, showing an increasing trend over the 24 months period (fig. 3).

In conclusion the technique proved effective in individual recognition of salamanders, moreover it allowed the collection of additional data about pattern variations within the sample. On the other hand some factors limit the applicability of the method (cf. FABER, 2001). Photographic techniques are quite laborious and expensive, and the risk of incorrect identification increase in direct proportion to the size of the sample. Also, pattern recognition should be carried out regularly, without interruptions; otherwise, the effectiveness of the method might be affected by pattern changes over the years (especially as regards to juvenile specimens), in proportion to the length of the discontinuance. Finally, the technique does not seem to be suitable for an automation by digital image analysis, due to the heterogeneity of mug shots.

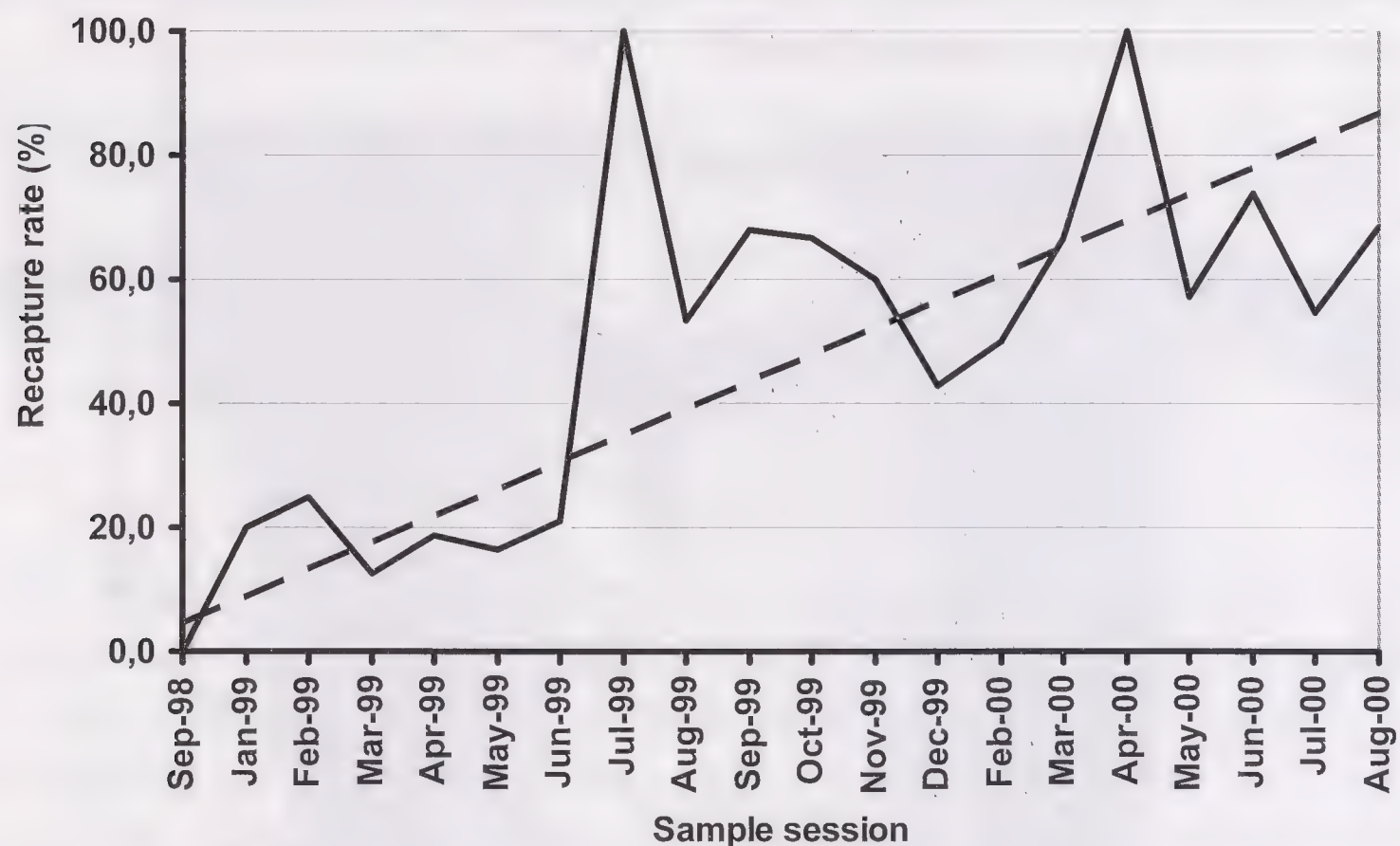


Fig. 3 - Recapture rate distribution over the study period; broken line shows the increasing trend.

REFERENCES

- CORTESOGNO L. & BALLETO E., 1989 - Lineamenti dell'ecologia dei Rettili e degli Anfibi dell'Alpe di Rezzo (Imperia) e considerazioni sulla erpetofauna delle faggete italiane - *Boll. Mus. Ist. biol. Univ. Genova*, 53 (1987): 123-140.
- FABER H., 2001 - Individual recognition of amphibians with special emphasis on PIT (passive integrated transponders) - *Pianura*, Cremona, 13: 17-24.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G. & BULLINI L., 1995 - Morphologic and genetic studies of the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) - *Monogr. Mus. reg. Sc. nat.*, Torino, 16, 368 pp.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2001 - Studi preliminari sull'ecologia di *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) nell'Appennino toscano-romagnolo (Caudata: Plethodontidae) - *Pianura*, Cremona, 13: 347-351.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2002a - Seasonal activity and spatial distribution of a *Speleomantes italicus* population in a natural cave - *Biota*, Petrovče, 3 (1-2): 119-126.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2002b - *Speleomantes* antipredator strategies: a review and new observations - *Biota*, Petrovče, 3 (1-2): 127-131.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2005 - Spacing of *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923): application of a Geographic Information System (G.I.S.) (Amphibia, Plethodontidae) - *Annali Mus. civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 97: 169-177.
- SALVIDIO S., 1997 - Tail injuries in *Speleomantes ambrosii* (pp. 313-316) - In: BÖHME W., BISCHOFF W. & ZIEGLER T. (Eds.), *Herpetologia Bonnensis*, Bonn, 416 pp.

- SALVIDIO S., 1998 - Estimating abundance and biomass of a *Speleomantes strinatii* (Caudata, Plethodontidae) population by temporary removal sampling - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 19 (2): 113-124.
- SALVIDIO S., LATTES A., TAVANO M. & MELODIA F., 1994 - Ecology of a *Speleomantes ambrosii* population inhabiting an artificial tunnel - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 15 (1): 35-45.
- VOESENEK L. A. C., VAN ROOY P. T. J. C. & STRIJBOCH H., 1987 - Some autoecological data on the Urodeles of Sardinia - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 8 (4): 307-314.

ABSTRACT

For two consecutive years individual recognition of *Speleomantes italicus*, by means of dorsal pattern «mug shots», was tested; pattern variations caused by age and among individuals were also recorded. Within the studied population three main «pattern phenotypes» were arbitrarily recognized. Juveniles display few, almost reddish speckles on the darker ground colour («juvenile» phenotype); as time goes by, speckles increase in larger markings, due to the appearance of ochra-reddish chromatophores. In larger immatures and adult salamanders light markings may be arranged in quite defined blotches («blotched» phenotype), as well as in marblings («marbled» phenotype).

Over the study period 243 cave salamanders (60 males, 58 females and 125 immatures) were individually recognized, and salamanders recognition was possible even two years after their first capture. In agreement with those observed for *S. strinatii*, the calculated density of *S. italicus* was 0.8 individuals/m². Recapture rate showed an increasing trend over the 24 months period, averaging 48.8%.

The technique proved effective in individual recognition of salamanders, although quite laborious and expensive, as well as not suitable for an automation by digital image analysis.

RIASSUNTO

Riconoscimento tramite il disegno individuale di *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) (Amphibia, Plethodontidae).

Per due anni consecutivi è stato sperimentato il riconoscimento individuale di *Speleomantes italicus*, mediante fotografie della colorazione dorsale; sono state inoltre registrate le variazioni della colorazione tra i diversi individui, nonché in funzione dell'età. All'interno della popolazione studiata sono stati arbitrariamente riconosciuti tre principali fenotipi di colorazione. Gli individui giovani hanno poche macchioline, per lo più rossastre, sul colore di fondo più scuro (fenotipo «giovanile»); col passare del tempo le macchioline si estendono in macchie più grandi, grazie alla comparsa di cromatofori ocra-rossastri. Negli individui immaturi più grandi e negli adulti le ornamentazioni chiare possono essere organizzate sia in macchie piuttosto definite (fenotipo «macchiato»), che in marmorizzazioni (fenotipo «marmorizzato»).

Nell'arco del periodo di studio sono stati riconosciuti individualmente 243 geotritoni (60 maschi, 58 femmine e 125 immaturi) e il riconoscimento è stato possibile fino a 2 anni di distanza dalla prima cattura. In accordo con quanto osservato per *S. strinati*, è stata calcolata per *S. italicus* una densità di 0,8 individui/m². Nell'arco del periodo di 24 mesi il tasso di ricattura ha mostrato una tendenza all'incremento (media = 48,8%).

La tecnica si è dimostrata efficace per il riconoscimento individuale dei geotritoni, seppur piuttosto laboriosa e dispendiosa, nonché inadatta ad un'automazione tramite analisi d'immagine digitale.

RES LIGUSTICAE CCXLIX

FABRIZIO ONETO* & SEBASTIANO SALVIDIO*

DATI PRELIMINARI SULLA DISTRIBUZIONE DELLE
PREDE DI *SPELEOMANTES STRINATII* (AELLEN)
NELLA STAZIONE BIOSPELEOLOGICA
DI S. BARTOLOMEO (GE)
(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUZIONE

Il geotritone di Strinati *Speleomantes strinati* (Aellen, 1958) è un predatore opportunisto, legato a una notevole varietà di prede, soprattutto invertebrati del suolo e volanti (MORISI 1981; SALVIDIO 1992; SALVIDIO *et alii* 1994). Le popolazioni epigee di questa specie si nutrono di Molluschi, Aracnidi, Isopodi e numerosi gruppi di insetti tra cui Collemboli, Coleotteri, Ditteri e Imenotteri (SALVIDIO 1992), mentre quelle cavernicole catturano in prevalenza Ditteri Limonidi che abbondano sulle pareti umide delle cavità sotterranee (MORISI 1981; SALVIDIO *et alii* 1994). Le popolazioni cavernicole di geotritone mostrano un ciclo di attività stagionale ben definito, con minimi in inverno e massimi in primavera-estate (SALVIDIO *et alii* 1994).

Il presente studio ha come scopo quello di mettere in relazione l'attività di una popolazione di *S. strinati* con la disponibilità delle sue potenziali prede, all'interno della Stazione Biospeleologica di S. Bartolomeo di Besolagno. In questo sito l'alimentazione dei geotritoni avviene prevalentemente a spese del Dittero *Limonia nubeculosa* Meigen, 1804 (SALVIDIO *et alii* 1994).

* Dipartimento per lo studio del Territorio e delle sue Risorse, Università di Genova, Corso Europa 26, 16132 Genova, Italia & Gruppo Speleologico Ligure "A. Issel", Busalla (GE), Italia; e-mail: salvidio@dipteris.unige.it

MATERIALI E METODI

La Stazione Biospeleologica di S. Bartolomeo si trova a 392 m s.l.m. in Valle Scrivia, nel comune di Savignone (GE). Si tratta di un ex rifugio antiaereo, scavato con cariche di mina nella Seconda Guerra Mondiale e colonizzato spontaneamente da una popolazione di geotritoni da ormai 30 anni (PASTORINO & PEDEMONTE 1974). L'ingresso, con esposizione Nord-Est, si trova 1 m sotto il livello del suolo ed è accessibile per mezzo di una scaletta. L'entrata è chiusa con un grata di ferro e l'andamento della cavità si presenta orizzontale con curve e diramazioni per circa 35 m (PASTORINO *et alii* 1997). All'interno, sono stati collocati strumenti per la misura della temperatura e dell'umidità relativa. Le pareti della cavità sono state suddivise, tramite fili di nylon, in settori di circa 1 m² ciascuno e la quadrettatura arriva fino a 24 m dall'imbocco.

La disponibilità e la distribuzione spaziale delle potenziali prede dei geotritoni è stata stimata collocando all'interno della stazione trappole adesive, costituite da fogli di acetato trasparente (21 x 29,7 cm) spalmati con colla entomologica su entrambi i lati. Sette trappole, collocate ogni 4 metri lungo i primi 24 m del cunicolo, sono state appese al soffitto della cavità. Inoltre, una trappola è stata collocata anche all'esterno, in prossimità dell'entrata. Ogni mese le trappole sono state rimosse, controllate e sostituite. Il riconoscimento sistematico degli invertebrati catturati è stato effettuato a livello di Ordine o Sottoclasse, a seconda del gruppo sistematico. Durante ogni campionamento mensile sono state rilevate le temperature dell'aria all'esterno e all'interno in corrispondenza di ciascuna trappola ed è stato effettuato il conteggio degli esemplari di geotritone in attività sulle pareti della cavità. Nel mese di luglio 2002, il numero delle trappole all'interno del cunicolo è stato aumentato: una ad ogni metro, in modo da ottenere una stima più accurata della distribuzione spaziale delle prede nel periodo di massima attività dei geotritoni, sono pertanto state utilizzate 24 trappole adesive. La posizione di ogni esemplare di geotritone relativa alla quadrettatura della cavità è stata annotata su una apposita scheda.

In luglio 2002 l'abbondanza, la struttura e la distribuzione spaziale della popolazione di *Speleomantes strinatii* sono state stimate tramite un esperimento di rimozione temporanea, durante il quale gli animali sono stati rimossi dal loro ambiente in tre occasioni suc-

cessive. Ogni individuo catturato è stato misurato con un righello trasparente, valutando la lunghezza corporea tra l'apice del muso e il margine posteriore della cloaca. Il peso è stato determinato con due dinamometri Pesola, uno con portata 5 g e sensibilità 0,1 g, l'altro con capacità 10 g e sensibilità 0,2 g. Il sesso degli esemplari adulti è stato riconosciuto in base alla presenza nei maschi di un corpo ghiandolare mentoniero (LANZA 1959). Poiché le femmine diventano riproduttive ad una lunghezza corporea superiore ai 58 mm (SALVIDIO 1993), gli individui di dimensioni inferiori sono stati considerati immaturi. Al termine dello studio gli esemplari sono stati liberati all'interno del loro habitat.

La stima dell'abbondanza numerica della popolazione è stata effettuata sul totale degli individui catturati in tre successive occasioni, tramite il programma Capture (WHITE *et alii* 1982). Le relazioni tra le temperature e l'abbondanza stagionale di geotritoni e degli invertebrati sono state analizzate tramite il coefficiente di regressione (*r*).

RISULTATI

Nel corso dello studio sono stati catturati con le trappole adesive 1202 invertebrati: tutti artropodi appartenenti a vari gruppi sistematici. In tutti i campionamenti mensili, i Ditteri risultano il gruppo più numeroso, rappresentando più del 97% del totale (tab. 1).

Tab. 1 - Numero totale di invertebrati catturati per gruppo sistematico e relative percentuali. Il totale comprende anche gli esemplari catturati nel campionamento intensivo di luglio con 24 trappole.

Classe	Ordine	Numero catture	% catture
Chilopodi	Litobiomorfi	1	0,08
Aracnidi	Araneidi	23	1,90
Insetti	Imenotteri	4	0,33
	Ditteri	1166	97,01
	Omotteri	1	0,08
	Coleotteri	7	0,60
Totale		1202	100,00

Per quanto riguarda la distribuzione delle prede lungo la cavità, si osserva una presenza maggiore nei pressi dell'ingresso, a cui fa seguito una distribuzione piuttosto uniforme nel resto della galleria (tab. 2). Nel sito di studio, la disponibilità di prede tende ad aumentare fra marzo ed agosto, quindi il totale sembra calare a partire da settembre tornando verso i più bassi valori primaverili (tab. 2).

Tab. 2 - Distribuzione degli invertebrati nel periodo di studio (7 trappole per mese): * indica la mancanza dei dati a causa di una rimozione della trappola da parte di estranei.

	Mese di campionamento							
	marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	Totale
Zona campionata								
Esterno	110	138	129	167	155	*	142	841
Interno								
1 m	9	7	21	7	15	5	9	73
4 m	3	2	4	3	6	7	7	32
8 m	3	3	12	2	12	17	7	56
12 m	1	0	5	5	6	29	5	51
16 m	1	4	3	1	8	27	2	46
20 m	2	4	3	5	5	18	7	44
24 m	4	5	0	7	0	13	4	33
Tot. interno	23	25	48	30	52	116	41	1176

Non è emersa nessuna relazione statisticamente significativa tra le temperature e l'abbondanza degli invertebrati catturati lungo la cavità ($P > 0.25$ in tutti i casi). Per quanto riguarda invece i geotritoni, è stata osservata una relazione significativa con la temperatura misurata a 4 metri dall'ingresso ($r = 0,78$, $N = 7$, $P = 0,037$).

Durante il conteggio effettuato con 24 trappole a luglio, sono stati raccolti 184 esemplari, tutti artropodi. Anche in questo caso il 97% degli esemplari appartiene all'ordine dei Ditteri, confermando i risultati ottenuti per l'intero periodo di studio. La disponibilità di prede lungo la galleria mostra una tendenza a diminuire a partire dall'ingresso verso la parte più interna (fig. 1).

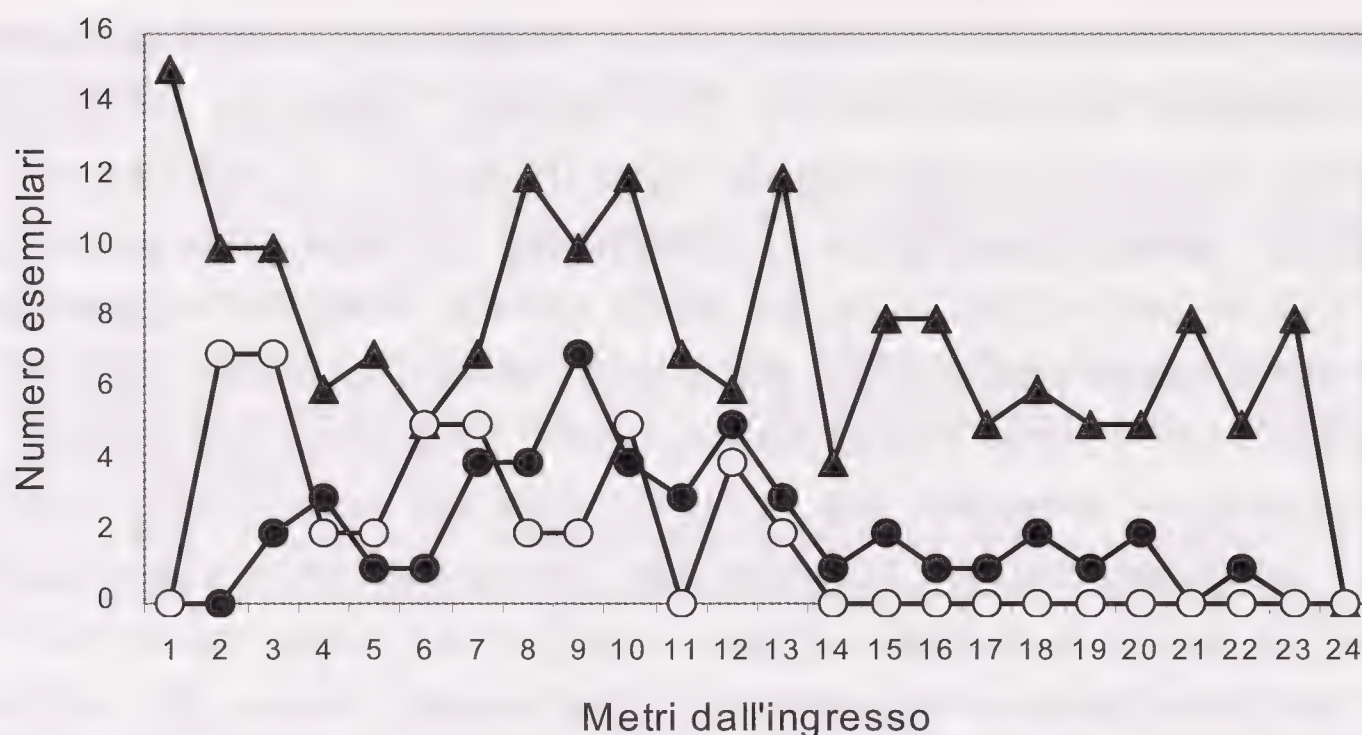


Fig. 1 - Andamento della distribuzione spaziale dei Ditteri (triangolo nero), dei geotritoni giovani (cerchio bianco) e degli adulti (cerchio nero) all'interno del sito di studio, nel mese di luglio 2002.

Per quanto riguarda i geotritoni, l'abbondanza di giovani ed adulti è stata stimata rispettivamente in 39 e 62 individui, per una popolazione totale valutabile in 102 individui (errore standard 1,8). Giovani ed adulti presentano una distribuzione diversa sulle pareti della cavità. Infatti i giovani risultano concentrati nei primi 13 metri, con una drastica diminuzione nella parte più interna della galleria, mentre gli adulti presentano una distribuzione concentrata nella zona centrale della galleria, con circa il 53% degli individui (fig. 1). Confrontando la distribuzione dei predatori con quella delle prede, non sono stati ottenuti risultati statisticamente significativi né considerando la numerosità (fig. 1) né l'andamento del peso delle singole classi e dell'intera popolazione ($P > 0,05$ in tutti i casi). Tuttavia se si tiene conto delle diverse condizioni di luminosità (che si riflettono sulle variazioni di temperatura e di umidità relativa) si perviene a risultati più interessanti. Infatti, nella zona buia della galleria (oltre i 7 metri circa dall'ingresso), esistono relazioni significative fra la biomassa delle singole classi di età e la distribuzione delle prede ($P < 0,05$ in tutti i casi).

CONCLUSIONI

Benché questo sia da considerare uno studio preliminare, si possono tuttavia trarre alcune conclusioni generali. Le potenziali prede

dei geotritoni mostrano un netto ciclo stagionale di abbondanza, che risulta massima nei mesi estivi. Per quanto riguarda la numerosità dei Ditteri catturati all'interno del sito di studio, si osserva una netta diminuzione lungo la galleria. I geotritoni giovani colonizzano principalmente la parte più esterna della cavità dove si raggruppano e dove le condizioni ambientali sono più variabili, mentre gli adulti si concentrano nel primo tratto susseguente alla zona illuminata. Valutando le relazioni esistenti tra i geotritoni e gli invertebrati nell'intera galleria, non si ottengono correlazioni statisticamente significative, in quanto l'intensità luminosa appare un fattore importante nel determinare la distribuzione spaziale dei geotritoni, come già evidenziato da PASTORELLI *et alii* (2002).

In conclusione si può ipotizzare che nella Stazione Biospeleologica, i rapporti tra prede e predatori siano influenzati dalla combinazione di vari fattori, fra cui intensità luminosa e umidità relativa mentre la temperatura sembra giocare un ruolo secondario. Inoltre, le relazioni tra prede e predatori appaiono più strette nella zona della galleria dove esiste una maggiore stabilità ambientale. Occorrerà in ogni caso attendere di avere a disposizione dati più completi per valutare in maniera approfondita gli effetti delle interazioni tra le diverse variabili esaminate.

RINGRAZIAMENTI

Lo studio dei geotritoni è stato condotto con autorizzazione del Ministero dell'Ambiente, Servizio Conservazione della Natura (SCN/2D/2001/378). Si ringrazia Anna Bonardi per la lettura critica del manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

- LANZA B., 1959 - Il corpo ghiandolare mentoniero dei "Plethodontidae" (Amphibia, Caudata) - *Monit. zool. ital.*, Firenze, 67 (1-2):15-53.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G. & BULLINI L., 1995 - Morphologic and genetic studies on the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) - *Monogr. Mus. reg. Sc. nat.*, Torino, 16, 368 pp.
- MORISI A., 1981 - Osservazioni sulla dieta in natura del geotritone *Hydromantes italicus* Dunn (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Riv. piem. St. nat.*, Carmagnola, 2: 79-87.

- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2002 - Seasonal activity and spatial distribution of a *Speleomantes italicus* population in a natural cave - *Biota*, Petrovče: 3 (1-2): 119-126.
- PASTORINO M.V. & PEDEMONTE S., 1974 - Nuove stazioni di raccolta del geotritone nell'Oltregiovo genovese - Atti XI Congr. naz. Speleol., *Mem. XI Rass. spel. it.*, Genova, 2: 81-82.
- PASTORINO M.V., SALVIDIO S. & TAVANO M., 1997 - La stazione biospeleologica di San Bartolomeo (Savignone, GE) - Atti XVII Congr. naz. Speleol., Castelnovo Garfagnana: 47-50.
- SALVIDIO S., 1992 - Diet and food utilization in a rock-face population of *Speleomantes ambrosii* (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Vie Milieu*, Paris, 42 (1): 35-39.
- SALVIDIO S., 1993 - Life history of the European plethodontid salamander *Speleomantes ambrosii* (Amphibia, Caudata) - *Herpet. J.*, London, 3: 55-59.
- SALVIDIO S., LATTES A., TAVANO M. & MELODIA F., 1994 - Ecology of a *Speleomantes ambrosii* population inhabiting an artificial tunnel - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 15 (1): 35-45.
- WHITE G.C., ANDERSON D.R., BURNHAM K.P. & OTIS D.L., 1982 - Capture-recapture and Removal Methods for Sampling Closed Populations. Los Alamos National Laboratory 8787 NERP - Los Alamos, New Mexico, 235 pp.

RIASSUNTO

L'abbondanza degli esemplari di *Speleomantes strinatii* e delle potenziali prede è stata stimata da marzo a settembre 2002, all'interno della Stazione Biospeleologica di S. Bartolomeo di Besolagno (GE). La frequenza degli invertebrati è stata valutata utilizzando trappole adesive che sono state appese all'esterno e lungo la cavità ad una distanza di 4 m l'una dall'altra, fino a 24 m dall'ingresso. Durante il mese di luglio sono state posizionate 24 trappole, un metro l'una dall'altra, al fine di ottenere dati più puntuali sulla distribuzione delle prede.

I risultati preliminari mostrano che, degli oltre 1200 invertebrati catturati con le trappole, circa il 97% è rappresentato da Ditteri. L'abbondanza delle prede varia nei mesi e decresce sempre dall'esterno verso l'interno. Non sono state trovate correlazioni significative tra abbondanza di geotritoni e di prede lungo l'intera cavità, ma escludendo il tratto più esterno ed illuminato, si osserva una stretta relazione tra numero di prede e di predatori.

ABSTRACT

Preliminary data on the distribution of the preys of *Speleomantes strinatii* (Aellen) in S. Bartolomeo (GE) Biospeleological Station (Amphibia, Plethodontidae).

The availability of potential prey for the European plethodontid *Speleomantes strinatii* was studied, from March to September 2002, in the Biospeleological Station of S. Bartolomeo di Besolagno (Genova province, Liguria, NW Italy). Adhesive traps were placed outside and inside the underground environment every four

meters from the entrance, up to 24 meters inside. In July, traps were located every meter along the cavity, to assess prey availability and distribution during the highest activity of salamanders. Overall more than 1200 potential preys were caught and Dipterans constituted the 97% of total catches. Trapped Invertebrates showed seasonal variation in activity inside the study site.

As expected, prey abundance was higher outside and near the entrance, while it decreased towards the inner part of the cavity. There was no relationship between prey and salamander abundance along the cavity, but when the external illuminated zone was excluded from calculations significant statistical correlations were found. These preliminary results show that the salamander distribution inside underground sites was probably influenced by the interaction of several factors, such as light intensity, air humidity together with prey abundance.

CHRISTIAN PASTORELLI*, PAOLO LAGHI**
& DINO SCARAVELLI***

SPACING OF *SPELEOMANTES ITALICUS* (DUNN, 1923):
APPLICATION OF A GEOGRAPHIC
INFORMATION SYSTEM (G.I.S.)

(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

Geographic Information System (G.I.S.) is defined as: «an organized set of hardwares, softwares and people purposed to the acquisition, management, analysis, and visualization of alphanumeric and graphic informations referred to a determinate territory» (BALLESTRA *et alii* 1996, translated from Italian). In practice G.I.S. allows to represent determinate kinds of informations (i.e. georeferred data falling within a class or a physical quantity, that are positioned in a determinate reference system, usually a Cartesian one, such as UTM or Gauss-Boaga), showing them in form of maps.

Geographic Information Systems allow to carry out spatial analysis and manage large amounts of data with sustainable time and costs and are employed mainly in technological webs management, urban and territorial planning, and natural sciences (geobotany, faunistic, ecology, etc.) (cf. BALLESTRA *et alii* 1996), but so far G.I.S. have been used in herpetology only in few cases (VIGATO *et alii* 2001; CARAFA & BIONDI 2002).

This paper reports the results obtained from the first applica-

* Via Cerchia di Sant'Egidio 2205, 47023 Cesena (FC), Italia;
e-mail: pastorellic@libero.it

** Via Bruno Costante Garibaldi 22, 47100 Forlì (FC), Italia;
e-mail: spelerpes@libero.it

*** Associazione Chiroptera Italica, Via Veclezio 10/A, 47100 Forlì (FC), Italia;
e-mail: dinosc@tin.it

tion of G.I.S. in the study of Italian cave salamander *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) spacing strategies.

MATERIALS AND METHODS

The study site is a natural cave called «Grotta del Tritone», 43°53'52'' N - 11°58'06'' E, near Bagno di Romagna, (province of Forlì-Cesena, Italy), already described by PASTORELLI *et alii* 2002a. The *Speleomantes italicus* population gravitating around the cave is object of a long-term study in order to investigate several natural history traits, such as population structure, seasonal activity, habitat use and displacement, and behaviour (PASTORELLI *et alii* 2001, 2002a and 2002b; LAGHI *et alii* 2005).

The site was visited monthly from January 1999 to December 2000 and during each sample session salamanders were searched for by two persons inside and outside the cave (close to the entrance) for about an hour. For each salamander captured, sex, body length (from the snout tip to the anterior end of the vent), distance from the entrance and from the cave floor were recorded. Adult salamanders were sexed by means of the observation of exterior secondary sexual characters -i.e. the presence, in the adult males, of a mental body gland (LANZA 1959) and enlarged premaxillary teeth- and all individuals reaching a wider body length than the smallest male possessing a mental body gland (41 mm) were considered as adults; as in *Speleomantes* females reach sexual maturity at a larger size than males (SALVIDIO 1993), in this study some large subadults were likely considered as adult females.

Salamanders were photographed to allow individual recognition by means of comparison of the dorsal patterns (SALVIDIO *et alii* 1994; LAGHI *et alii* 2005) and at the end of each session were released at their capture site.

A virtual map, integrated in a Cartesian reference system in real scale, with co-ordinates in meters, was obtained from the longitudinal section of the cave, with the aid of softwares ArcView GIS version 3.1 and Topol 4.0 (see figs. 1-3 and fig. 4, above). Another virtual space (see fig. 4, below), representing on the same plane the cave floor and walls, was created to allow a reliable calculation of home range size. For the sake of ease, in this latter space cave

floor was assumed to be 2 m wide along the whole extension of the cavity; actually floor width range from 0.4 to 3.2 m, 2 m being the average value in the first 25 meters from the entrance.

Data about spacing of *S. italicus* were integrated in both virtual spaces by software ArcView GIS version 3.1, then processed by software Animal Movement for Spatial Analyst 2.04 Beta, by means of kernel (95% and 50%) method, a nonparametric statistical method for estimating probability densities from a set of points. The resulting graphs provide immediate visualization of the probability of find animals in any one space, by means of a colour scale (RODGERS & CARR 2002).

Calculation of home range shape and size, by means of the Minimum Convex Polygon (MCP) model, were also provided by Animal Movement for Spatial Analyst 2.04 Beta.

RESULTS AND DISCUSSION

During the study period 440 records on the spacing of *S. italicus* were collected (236 in the year 1999 and 204 in the year 2000). Some data, which were not included in calculations in the study by PASTORELLI *et alii* (2002a), have been herein taken into account, therefore sample size is larger than that reported in the previous paper.

Spatial distribution of salamanders was statistically different between the two years (Student $t = -2.437$, $df = 438$, $P = 0.015$), thus data obtained in different years were separately processed.

The number of active salamanders observed in the study site (mainly on cave walls and floor, rarely under stones or in clefts, both inside and outside the cave) was related to distance from the entrance, in function of sex (two records, referring to unsexed specimens, were excluded from calculations) and season. In all cases G.I.S. produced graphs that allow a quick and easy reading of the phenomena described by statistical analysis.

Cave salamanders were found at a mean distance from the entrance of 6.2 ± 4.4 m ($n = 236$) and 7.2 ± 4.6 m ($n = 204$) in the year 1999 and 2000 respectively. In both years only few salamanders ($n = 3$ in 1999; $n = 2$ in 2000) were observed outside the cave close to the entrance, and no captures were made inside the

cave beyond 25 meters from the entrance (fig. 1) confirming previous studies (CIMMARUTA *et alii* 1999: *S. strinatii* and *S. a. ambrosii*; MORISI 1981 and SALVIDIO *et alii* 1994: *S. strinatii*; PASTORELLI *et alii* 2001 and 2002a: *S. italicus*).

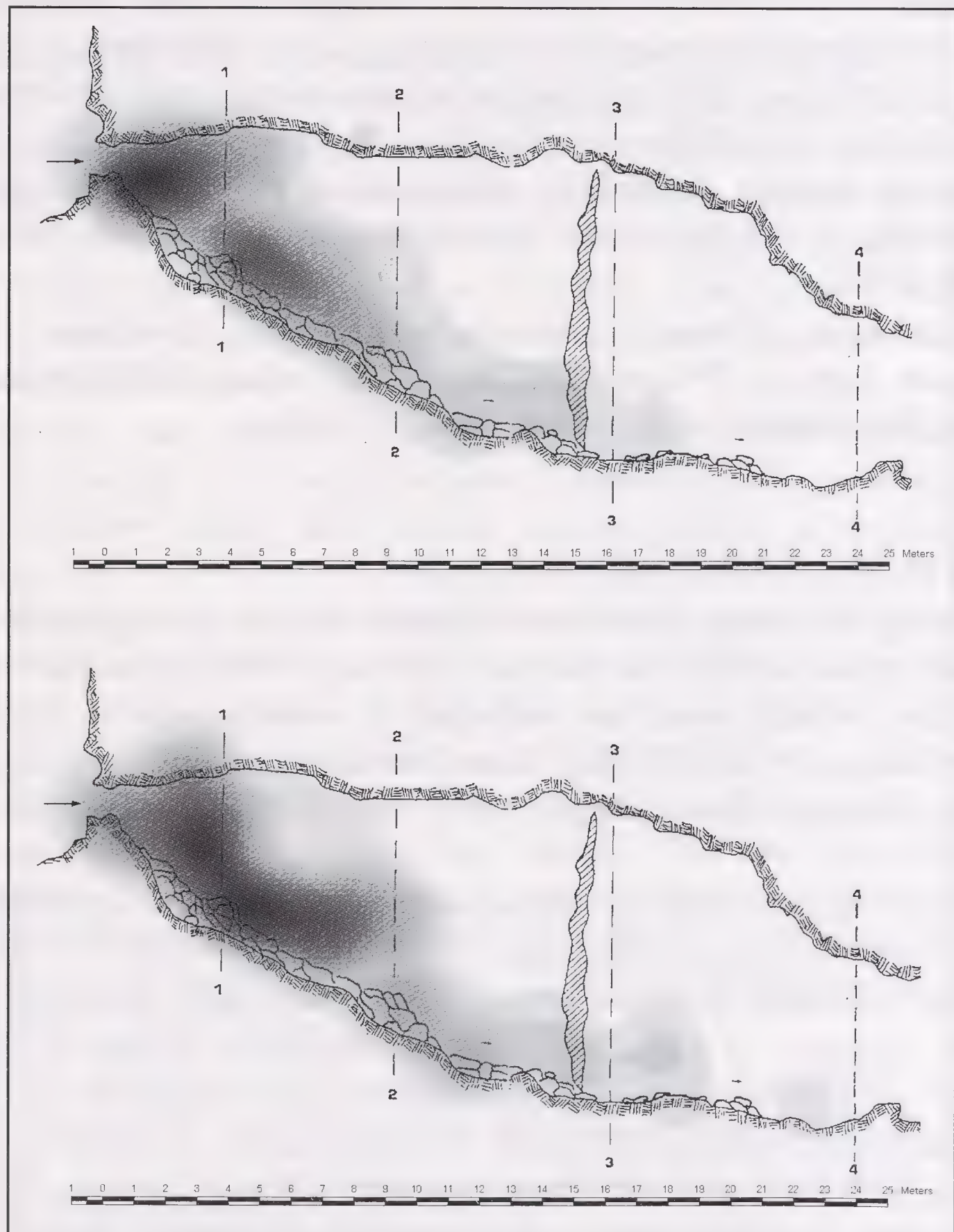


Fig. 1 - Distribution of captures in the year 1999 (above) and 2000 (below). The colour becomes darker as the estimated probability of salamander presence increases. 1-1, 2-2, 3-3, and 4-4 indicate where transversal sections (showed in the original drawing) were taken.

Juveniles were found on average more close to cave entrance (3.8 ± 2.8 m, $n = 110$ in 1999; 4.2 ± 2.7 m, $n = 93$ in 2000) than

adults (8.3 ± 4.4 m, $n = 125$ in 1999; 9.8 ± 4.4 m, $n = 110$ in 2000) (fig. 2). These data suggest that also in *S. italicus* a spatial segregation between juvenile and adult salamanders, such as that assessed by SALVIDIO & PASTORINO (2002) in *S. strinatii*, may occur (cf. also PASTORELLI *et alii* 2002a). No meaningful differences were found between spatial distributions of males and females in 1999, 2000 and both years added (Student *t*, $P > 0.05$ in all cases), although males were often found at an higher distance from the entrance than females.

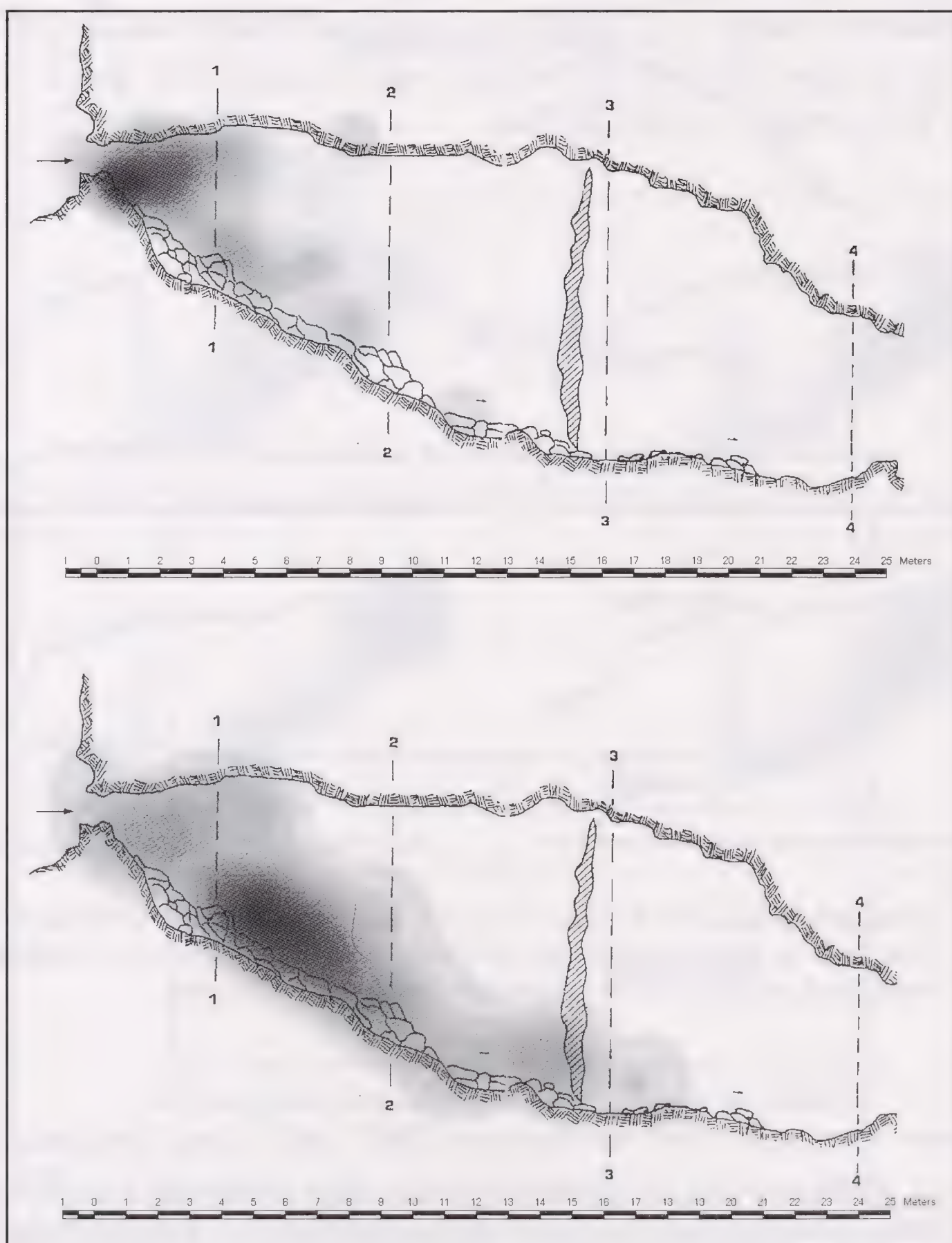


Fig. 2 - Spatial segregation between juvenile (above) and adult (below) *S. italicus* in the year 1999. The colour becomes darker as the estimated probability of salamander presence increases.

In summer, when external conditions are prohibitive, cave salamanders are usually found at higher distance from the entrance than in spring and autumn (PASTORELLI *et alii* 2002a: *S. italicus*; SALVIDIO *et alii* 1994: *S. strinati*; VOESENEK *et alii* 1987: *S. supramontis*). Fig. 3 shows that a similar seasonal spacing pattern occurred in the studied population in the year 1999. In summer months the animals were observed at a higher mean distance from the entrance (7.3 ± 4.4 m, $n = 45$) than in spring (5.5 ± 4.2 m, $n = 96$), and in autumn (7.0 ± 3.8 m, $n = 71$); in winter, when external environmental parameters were very similar to internal ones, cave salamanders were active close to cave entrance, even outside (4.3 ± 5.2 m, $n = 24$) (cf. PASTORELLI *et alii* 2002a).

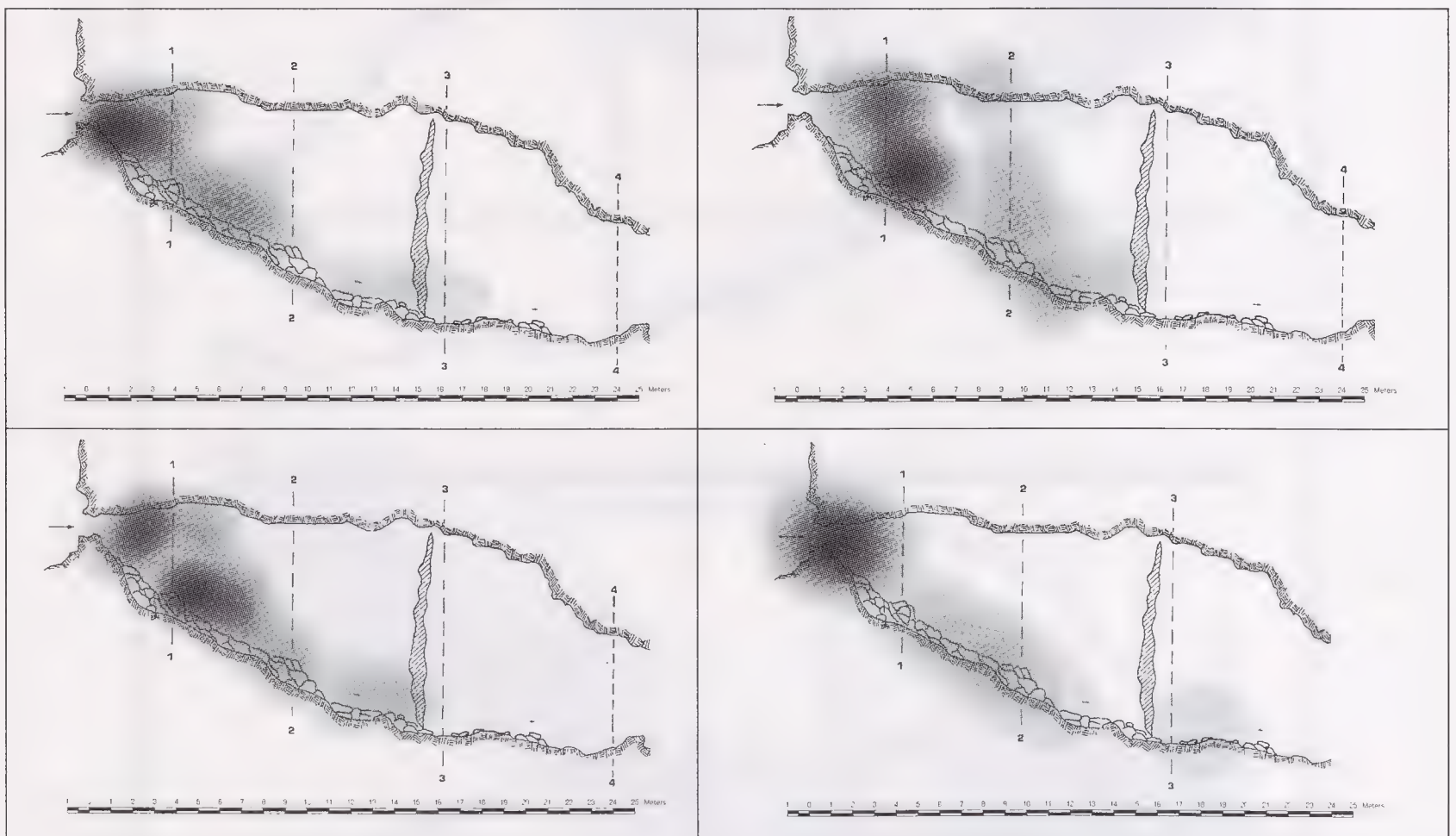


Fig. 3 - Seasonal spacing of *S. italicus* in the year 1999; clockwise from the upper left: spring, summer, winter, and fall. The colour becomes darker as the estimated probability of salamander presence increases

From January 1999 to August 2000 individual recognition by means of photographs of dorsal pattern was obtained for 215 specimens (108 immatures, 52 males and 55 females). Home range size, calculated only for 11 individuals captured at least 4 times, averaged 21.75 ± 25.24 m² (range = 1.75-82.26 m²). It goes without saying that the observed home range represents only a part of the actual

one, this latter being larger, as it extends also in rock interstices. Fig. 4 shows the home range of specimen n. 71, a female captured six times from May 1999 to July 2000. Data support LANZA's (1986) statement that cave salamanders possess much more vagility than is usually understood.

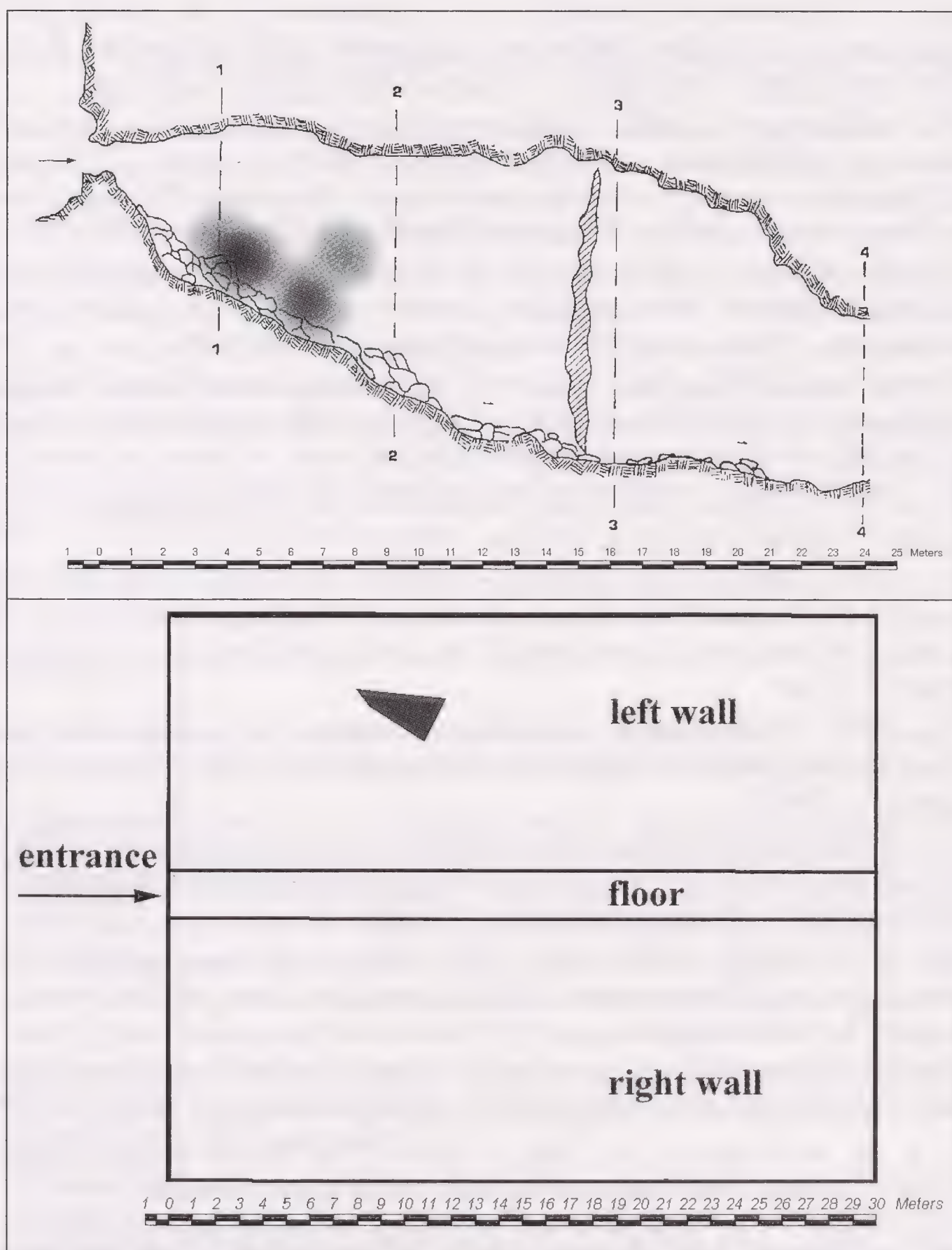


Fig. 4 - Home range of the specimen n. 71 (MCP size: 3.93 m²). Above: kernel graph on the longitudinal section of the cave (the colour becomes darker as the estimated probability of salamander presence increases); below: MCP graph on the virtual space representing on the same plane cave walls and floor.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Stefano Gellini and Franca Monti for the indispensable help provided in data processing.

REFERENCES

- BALLESTRA G., BERTOZZI R., BUSCAROLI A., GHERARDI M. & VIANELLO G., 1996 - Applicazione dei sistemi informativi geografici nella valutazione delle modificazioni ambientali e territoriali - Franco Angeli, Milano, 280 pp.
- CARAFÀ M. & BIONDI M., 2002 - Nuove metodologie d'indagine nello studio popolazione di *Salamandra salamandra giglioli* Eiselt & Lanza, 1956 in un'area dell'Appennino centrale: risultati preliminari - Riassunti 4° Congr. Naz. Societas Herpetologica Italica, Ercolano (Napoli), 18-22 giugno 2002: 50.
- CIMMARUTA R., FORTI G., NASCETTI G. & BULLINI L., 1999 - Spatial distribution and competition in two parapatric sibling species of European plethodontid salamanders - *Ethol., Ecol. & Evol.*, Firenze, 11: 383-398.
- LAGHI P., PASTORELLI C. & SCARAVELLI D., 2005 - Individual pattern recognition of *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) (Amphibia, Plethodontidae) - *Annali Mus. Civ. St. nat. G. Doria*, Genova, 97: 153-160.
- LANZA B., 1959 - Il corpo ghiandolare mentoniero dei "Plethodontidae" (Amphibia, Caudata) - *Monit. zool. ital.*, Firenze, 67 (1-2): 15-53.
- LANZA B., 1986 - I Rettili e gli Anfibi (pp. 289-321 & 549-550 + pl. XX-XXI) - In: CAMARDA I., FALCHI S. & NUDDA G. (Eds.), L'ambiente naturale in Sardegna (Elementi di base per la conoscenza e la gestione del territorio) - Carlo Delfino, Sassari, 557 pp.
- MORISI A., 1981 - Osservazioni sulla dieta in natura del geotritone *Hydromantes italicus* Dunn (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Riv. piem. St. nat.*, Carmagnola, 2: 79-87.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2001 - Studi preliminari sull'ecologia di *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) nell'Appennino tosco-romagnolo (Caudata: Plethodontidae) - *Pianura*, Cremona, 13: 347-351.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2002a - Seasonal activity and spatial distribution of a *Speleomantes italicus* population in a natural cave - *Biota*, Petrovče, 3 (1-2): 119-126.
- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2002b - *Speleomantes* antipredator strategies: a review and new observations - *Biota*, Petrovče, 3 (1-2): 127-131.
- RODGERS A. R. & CARR A. P., 2002 - HRE: The Home Range Extension for ArcView™ (Beta Test Version 0.9, July 1998) User's Manual.
- SALVIDIO S., 1993 - Life history of the European plethodontid salamander *Speleomantes ambrosii* (Amphibia, Caudata) - *Herpet. J.*, London, 3: 55-59.
- SALVIDIO S., LATTES A., TAVANO M. & MELODIA F., 1994 - Ecology of a *Speleomantes ambrosii* population inhabiting an artificial tunnel - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 15 (1): 35-45.
- SALVIDIO S. & PASTORINO M. V., 2002 - Spatial segregation in the European plethodontid *Speleomantes strinatii* in relation to age and sex - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 23: 505-510.

- VIGATO C., SCALI S. & GUIDALI F., 2001 - Una metodologia per l'individuazione delle metapopolazioni di anfibi - *Pianura*, Cremona, 13: 27-29.
- VOESENK L. A. C., VAN ROOY P. T. J. C. & STRIJBOCH H., 1987 - Some auto-ecological data on the Urodeles of Sardinia - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 8 (4): 307-314.

ABSTRACT

For two consecutive years *Speleomantes italicus* spacing were studied with the aid of a Geographic Information System (G.I.S.), in a natural cave in northern Apennines. Individual displacement and spacing patterns with regard to sex classes and season were analyzed. The salamanders are found only the first tract (up to 25 meters from the entrance) of the cave, which is the area providing contemporarily plenty of food and steady environmental conditions. There were no differences between male and female spatial distributions. Most immature specimens were observed close to cave entrance, while adults were active mainly in deeper zones.

The occurrence of a spatial segregation between juveniles and adult cave salamanders has already been assessed in *S. strinatii* and it is likely to occur also in *S. italicus*. Spacing patterns were strongly seasonal, with the highest mean distance from entrance recorded in summer, and the lowest one in winter. Home range size, estimated for 11 specimens captured at least four times, ranged from 1.75 to 82.26 m² (mean = 21.75 m²).

RIASSUNTO

Uso dello spazio in *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923): applicazione di un Sistema Geografico Informatizzato (G.I.S.) (Amphibia, Plethodontidae).

Per due anni consecutivi l'uso dello spazio di *Speleomantes italicus* è stato studiato, con l'aiuto di un Sistema Geografico Informatizzato (G.I.S.), in una cavità naturale dell'Appennino Settentrionale. Sono stati analizzati gli spostamenti individuali e le variazioni nell'uso dello spazio in funzione della stagione e del sesso. Gli animali frequentano esclusivamente il primo tratto (fino a 25 m dall'entrata) della cavità, ossia il settore che fornisce sia abbondante cibo sia condizioni ambientali stabili. Non sono state riscontrate differenze significative tra le distribuzioni spaziali dei maschi e delle femmine. La maggior parte degli individui immaturi sono stati osservati nelle vicinanze dell'ingresso della cavità, mentre gli adulti frequentano principalmente zone più profonde.

L'esistenza di una segregazione spaziale tra geotritoni giovani ed adulti è già stata verificata in *S. strinatii* ed è verosimile anche per *S. italicus*. La distribuzione spaziale dei geotritoni è fortemente condizionata dal ciclo stagionale, con la massima distanza media dall'ingresso registrata nei mesi estivi e la minima in inverno. La dimensione dello spazio vitale, stimata per 11 individui catturati almeno quattro volte, varia tra 1.75 e 82.26 m² (media = 21.75 m²).

GIANLUCA FORTI,* ROBERTA CIMMARUTA** & GIUSEPPE NASCETTI**

BEHAVIOURAL RESPONSES TO SEASONAL VARIATIONS
OF AUTOECOLOGICAL PARAMETERS IN POPULATIONS
OF *SPELEOMANTES STRINATII* (AELLEN, 1958)
AND *S. AMBROSII* (LANZA, 1955)

(AMPHIBIA, PLETHODONTIDAE)

INTRODUCTION

Plethodontid salamanders are characterized by specific and distinctive morphological and physiological features, which confine them to very humid environments and relatively mild temperatures. However, they are able to respond to adverse environmental conditions (low relative humidity and extreme temperatures), remaining in suitable underground refuges until conditions improve (JAEGER 1980; BOBKA *et alii* 1981; FEDER 1983; HAIRSTON 1987). The species belonging to *Speleomantes*, which is the only genus of the Plethodontid family present in Europe, are general predators which were long considered to live exclusively in caves, whereas it has been ascertained that, given favourable conditions in terms of humidity and temperature, they can also be found in epigean environments, especially at night (LANZA 1946, 1999; STEFANI 1969; SALVIDIO 1991; LANZA *et alii* 1995).

The ecological and ethological responses given by *Speleomantes* populations to the changes of various environmental parameters have been the object of a few studies (LANZA *et alii* 1995; LANZA 1999) until, recently, a number of research papers have been published

* Museo del Fiore, Piazza G. Fabrizio 17, 01021 Acquapendente (VT), Italia;
e-mail: museo.fiore@tin.it

** Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università della
Tuscia, Via S. Giovanni Decollato 1, 01100 Viterbo, Italia;
e-mail: cimmaruta@unitus.it & nascetti@unitus.it

on the ecology of *Speleomantes* populations in Italy (this volume). These studies have provided interesting data regarding population size and structure and their relationships with environmental parameters. There is still some doubt, however, on the interpretation of the behavioural responses of individuals found in hypogean or epigean habitat, and on their possible seasonal movements between these two habitats. We, therefore, decided to investigate the seasonal ecological responses given by two populations of *S. strinatii* and two of *S. ambrosii ambrosii* (FORTI *et alii* 1997; CIMMARUTA *et alii* 1999).

MATERIALS AND METHODS

The researches were carried out in two sites populated by *S. strinatii* (Aellen, 1958) (sites 1 and 2) and two by *S. a. ambrosii* (Lanza, 1955) (sites 3 and 4). Sites were selected from populations already genetically characterized to ensure their correct taxonomic identification (NASCETTI *et alii* 1996; FORTI *et alii* 1998). They were situated in easily accessible caves, with external rock walls that could also be inspected without difficulty at night. The location and main characteristics of the sites are shown in tab. 1. Environmental parameters of the four sites were regularly analysed from 1990 to 1997 and measurements of temperature (T) and relative humidity (H), both inside (T_i , H_i) and outside (T_e , H_e) the caves, were taken. Inside the cave, measurements were taken approximately 6-7 metres from the entrance. The availability of potential preys was also quantified by recording the number of invertebrates inside the cave either by direct count or, where they were present at high density, through estimation based on a 1m² surface sample area.

The surface activity of *Speleomantes* (i.e., specimens active on walls and floor either inside either outside the cave: N_i and N_e , respectively) was estimated by direct count. Outside the caves, counting was carried out over a standard sample area of approximately 200 m² around the entrance, starting two hours after sunset, when salamanders activity is potentially highest. On the basis of its total length each individual was classified in one of three age classes, according to DURAND (1970, 1973): I) newborns: juvenile individuals from hatching to 5-6 months (from 26 to 38 mm); II) juvenes: juvenile individuals from 6 months to three years (42 to 75 mm); III)

adults: individuals older than three years (length greater than 75 mm).

The correlation between the various parameters was extrapolated using the Pearson method.

Table 1 - Geographical location and environmental description of the four studied sites.

Site	Coordinates	Height (m)	Vegetation type	Canopy extent	Geological substrate	Cave length	Entrance width (m)
<i>S. strinatii</i>							
Site n. 1 (Rocca Roncallo)	44°20'16"N 09°28'01"E	435	mesophilous	100%	limestone	35	1,5 x 1,5
Site n. 2 (Baracchino)	44°16'25"N 09°33'23"E	760	mesophilous	100%	ophiolites	10,5	2,1 x 1,1
<i>S. ambrosii</i>							
Site n. 3 (Monte S. Nicolao)	44°15'37"N 09°30'43"E	720	termophilous	30%	ophiolites	11	3,6 x 1,2
Site n. 4 (Cassana)	44°12'37"N 09°51'27"E	180	mesophilous	100%	limestone	14,5	0,7 x 0,6

RESULTS

1) Seasonal activity in epigeal and hypogean habitats.

The observations carried out evidenced that all the four studied populations showed activity both inside and outside the hypogean part of the site. Moreover, there was a marked seasonal variation in the number of individuals found inside and outside the cave at each site, correlated to environmental parameters (figs. 1-4 and tab. 2).

In the *S. strinatii* population from site 1, surface activity of the individuals outside the cave (N_e) was higher in spring and autumn, the lowest degree of activity being observed in the summer (fig. 1a). Surface activity in the cave (N_i) was highest in summer and lowest in winter, with intermediate levels in spring and autumn (fig. 1a). At this site, the internal temperature (T_i) of the cave was higher during the summer but was relatively constant with respect to the outside temperature (T_e) which varied more greatly (fig. 1b). The relative humidity within the cave (H_i) was high and steady whilst the outside value (H_e) was variable, with summer minimums being directly related to rainfall in the area (fig. 1c).

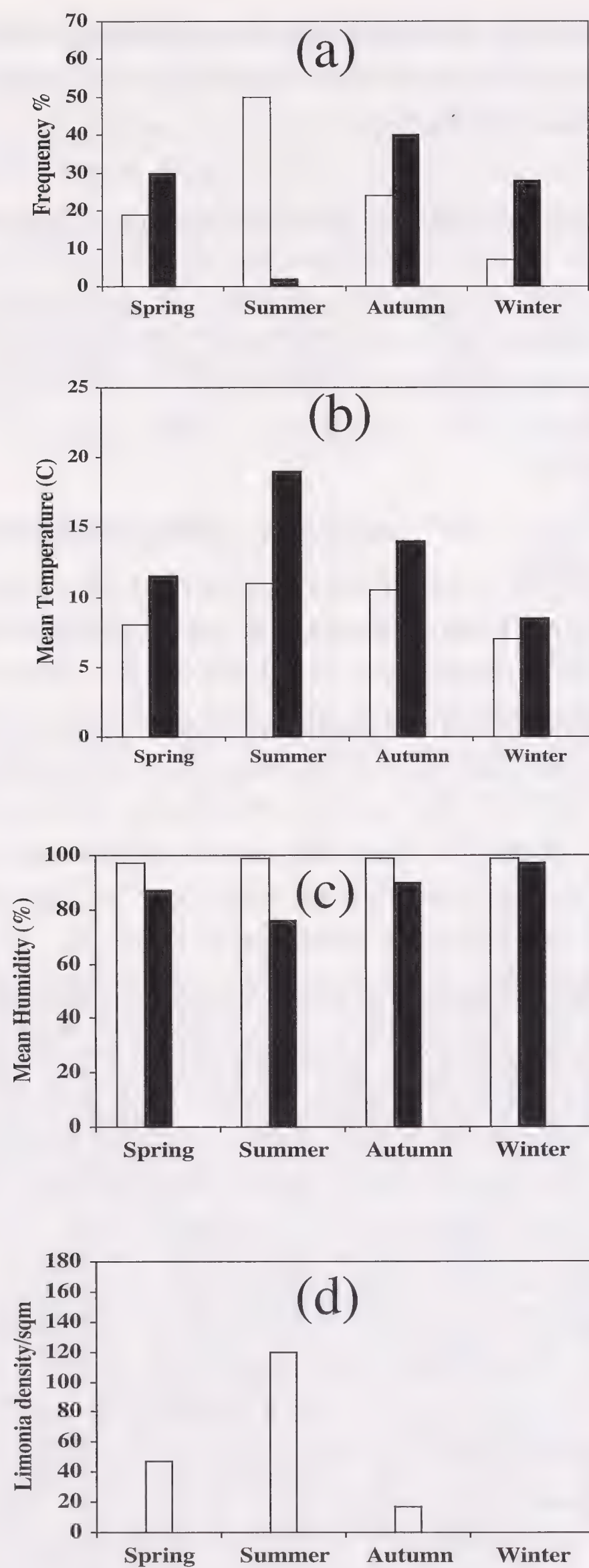


Fig. 1 - Mean values averaged per season of the following parameters recorded inside (white) and outside (black) the cave from *S. strinatii* site 1: a) number of specimens (N_i and N_e); b) temperature (T_i , T_e); c) humidity (H_i , H_e); d) density of *Limonia* flies (N_{lim}).

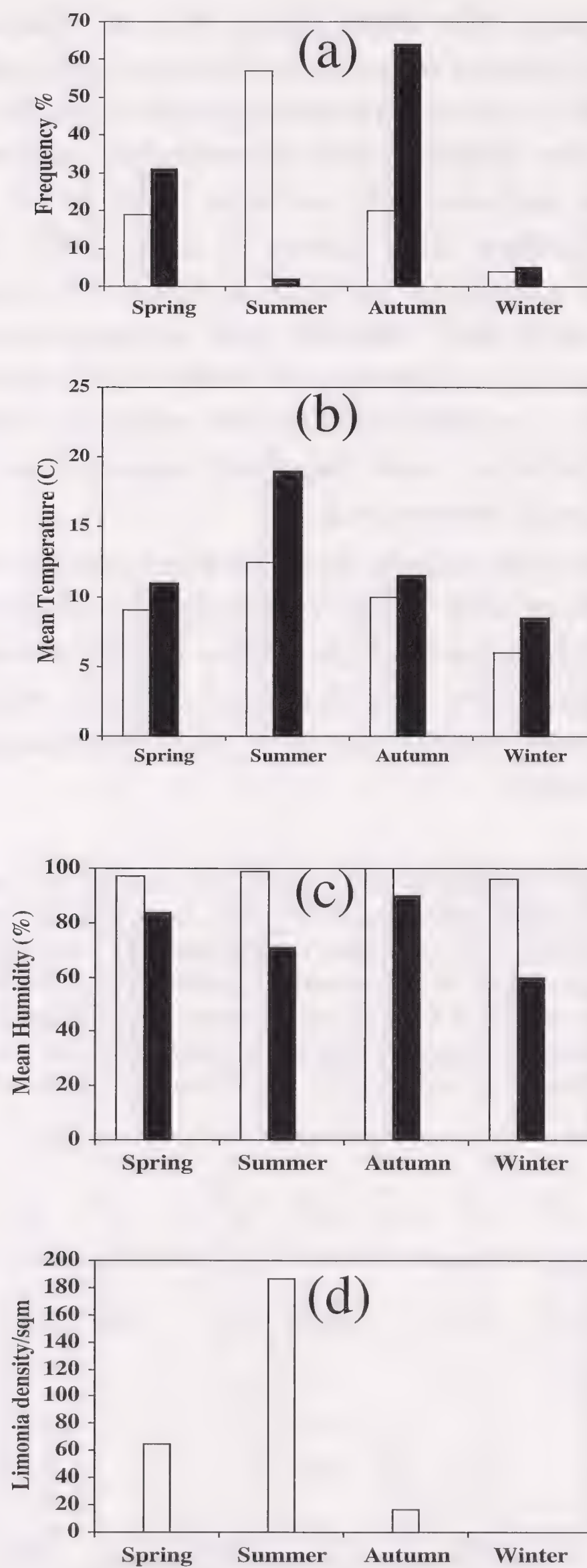


Fig. 2 - Mean values averaged per season of the following parameters recorded inside (white) and outside (black) the cave from *S. strinatii* site 2: a) number of specimens (N_i , N_e); b) temperature (T_i , T_e); c) humidity (H_i , H_e); d) density of *Limonia* flies (N_{lim}).

Moreover, inside the cave there was a marked presence in summer of flies (*Limonia nubeculosa* Meigen) (fig. 1d). These insects spend the summer in caves and other humid retreats and are actively preyed upon by the plethodontid salamanders, as can be seen from analysis of faeces and stomach contents (pers. obs.). As reported in tab. 2 in this population the number of individuals found inside the cave (N_i) showed a positive correlation with the internal and external temperature and flies' density and a negative correlation with external humidity. The number of individuals found outside the cave (N_e) showed a positive correlation with the external humidity and negative correlation with the flies' density and with both the internal and external temperature.

A similar seasonal pattern has also been observed in the *S. strinatii* population from site 2 (fig. 2, tab. 2). The number of individuals found within the cave (N_i) correlates positively with the internal and external temperature and the flies' density, whilst the number of individuals found outside the cave (N_e) correlates positively with the external humidity.

Table 2 - Correlation coefficients (r) between the number of *Speleomantes* observations inside (N_i) and outside (N_e) the cave and the environmental parameters recorded (T_i : internal temperature; T_e : external temperature; H_i : internal humidity; H_e : external humidity; N_{lim} : density of *Limonia* flies within the caves); + (-) positive (negative) significant correlation $P < 0.05$; ++ (--) positive (negative) highly significant correlation $P < 0.01$; +++ (---) positive (negative) very highly significant correlation $P < 0.001$.

Site	N_i					N_e				
	vs T_i	vs T_e	vs H_i	vs H_e	vs N_{lim}	vs T_i	vs T_e	vs H_i	vs H_e	vs N_{lim}
n. 1 <i>S. strinatii</i>	++	+++		-	+++	--	---		+++	--
	0.58	0.68		-0.42	0.67	-0.58	-0.67		0.81	-0.56
n. 2 <i>S. strinatii</i>	++	+			+				+++	
	0.68	0.62			0.66				0.78	
n. 3 <i>S. ambrosii</i>		-	++	+++					+++	
		-0.34	0.52	0.64					0.78	
n. 4 <i>S. ambrosii</i>	+++	+++			+++		-		+++	--
	0.62	0.541			0.564		-0.35		0.70	-0.440

In the *S. ambrosii* population from site 3 (fig. 3) we found, instead, a surface activity of the individuals in the cave (N_i) which

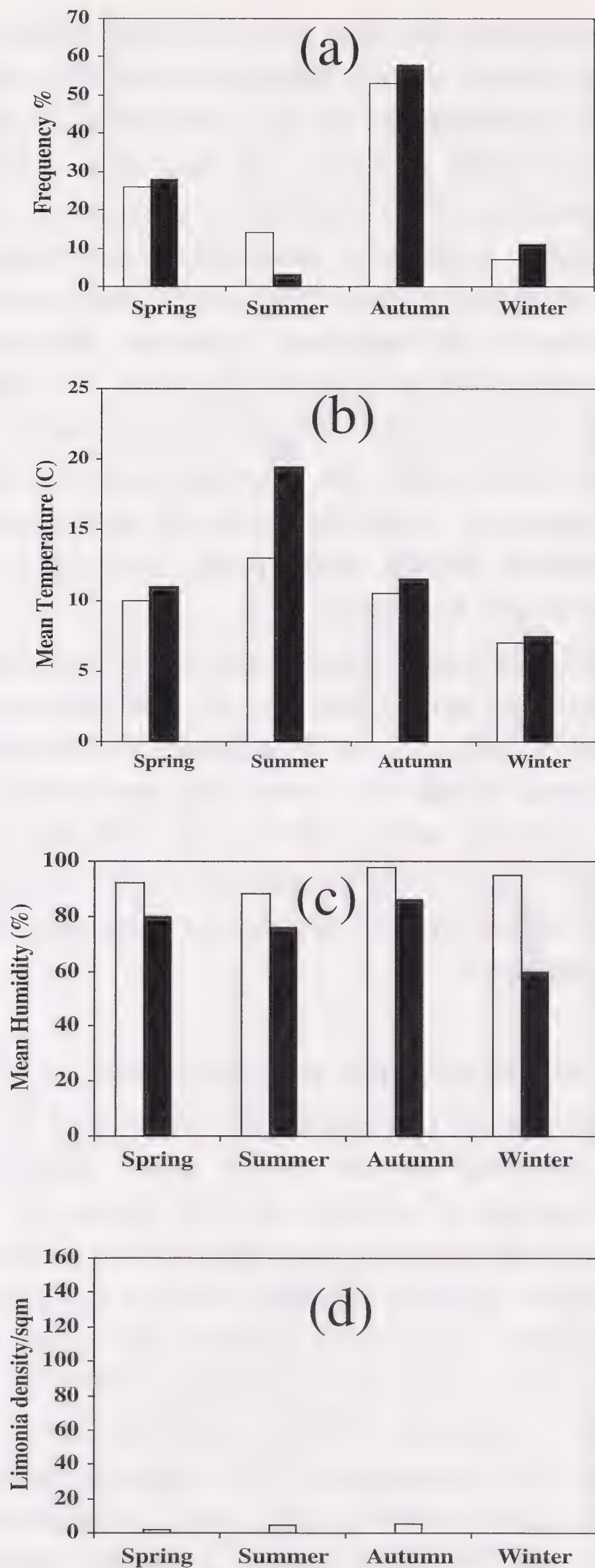


Fig. 3 - Mean values averaged per season of the following parameters recorded inside (white) and outside (black) the cave from *S. ambrosii* site 3: a) number of specimens (N_i and N_e); b) temperature (T_i , T_e); c) humidity (H_i , H_e); d) density of *Limonia* flies (N_{lim}).

is similar to that outside the cave (N_e), usually higher in spring and autumn, with the lowest values falling in summer (fig. 3a). At this site, the internal temperature of the cave (T_i) in summer reaches values higher than those recorded at the other studied sites, and the external temperature (T_e) undergoes greater variations (fig. 3b). The relative humidity inside the cave (H_i) is not constant and varies according to the external values (H_e) with lower values in summer (fig. 3c). Furthermore, in summer, *Limonia* flies are not present inside the cave with high numbers (fig. 3d). As shown in tab. 2, in this population the number of individuals found inside the cave (N_i) correlates positively with the internal and external humidity. It also correlates negatively with the external temperature, whilst the number of individuals found outside the cave (N_e) correlates positively with the external humidity.

In the *S. ambrosii* population from site 4 we found a seasonal pattern similar to that noted for the *S. strinati* populations from sites 1 and 2 (fig. 4, tab. 2). In this latter population, the number of individuals found inside the cave (N_i) correlates positively with the internal and external temperature and with the density of flies, whilst the number found outside the cave (N_e) correlates positively with the external humidity and negatively with the flies density and the external temperature.

2) Observations on the dispersal of individuals.

Individual movements between the cave and the outside environments were recorded at site 2 for three subsequent years by individual toe-clipping of adults, in the frame of an experiment of artificial syntopy (CIMMARUTA *et alii* 1999). A female recaptured for three consecutive seasons provided direct evidence of individuals moving repeatedly inside and outside the cave. First caught in the central part of the cave in November 1992, it was recaptured and marked again in January 1993 outside the cave, some 25 metres from the entrance. In September 1993, this specimen was captured once again in the central part of the cave. Salamanders move from inside to outside also in short times: a young specimen observed outside the cave, about 5m from the cave entrance, was inside the cave the following night. More generally, considerable movements were observed for several specimens, as far as 80m from the cave

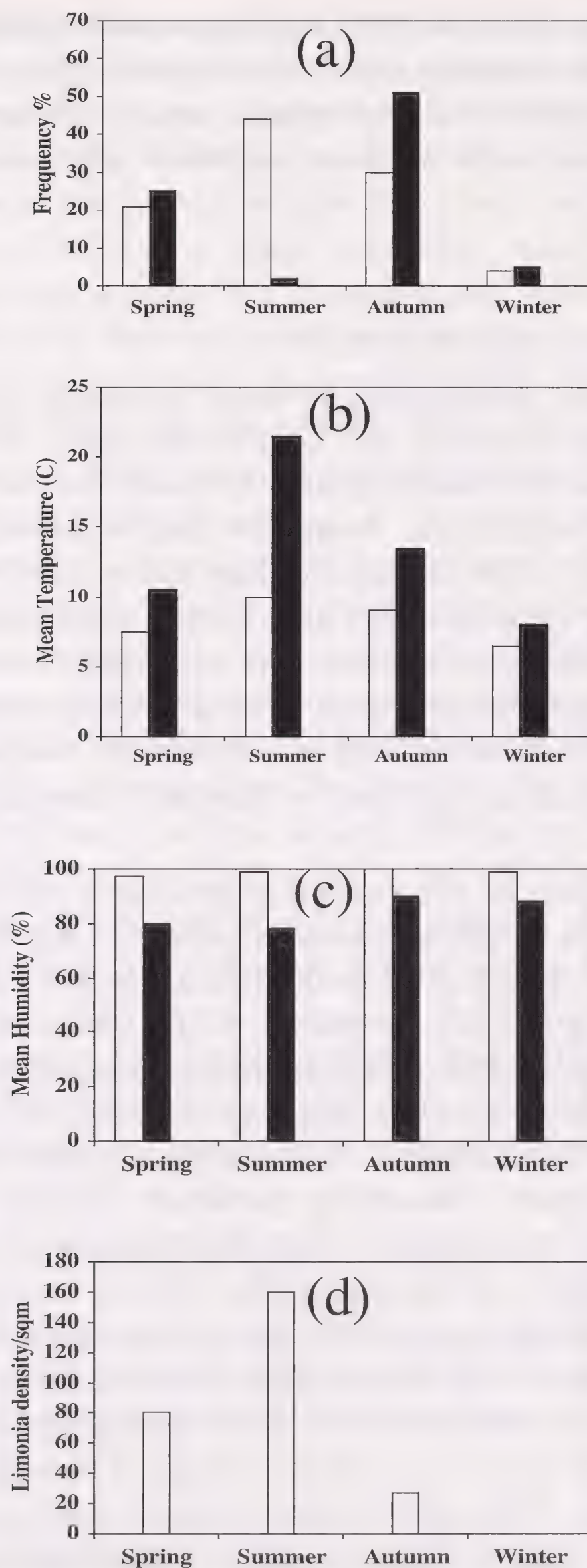


Fig. 4 - Mean values averaged per season of the following parameters recorded inside (white) and outside (black) the cave from *S. ambrosii* site 4: a) number of specimens (N_i , N_e); b) temperature (T_i , T_e); c) humidity (H_i , H_e); d) density of *Limonia* flies (N_{lim}).

entrance. Between October 1991 and September 1993, 21 specimens were observed alternatively inside and outside the cave during different surveys. Individual movements are in the order of tens of metres per month, with a mean recorded value of 0.5 (± 0.2) m/day.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

All the studied populations revealed a marked seasonal cycle in their surface activity inside and outside the caves. In all cases such pattern appear to be closely linked to main environmental parameters such as temperature, humidity and availability of trophic resources (tab. 2). In particular, the data show that the underground environment may be considered as a retreat, used mainly as a refuge from adverse climatic conditions. In this sense, retreats are more or less effective proportionally to their ability to preserve a relative humidity close to saturation and to provide the necessary density of invertebrate prey, as in the case of *Limonia nubeculosa*, summering in the caves.

The comparison of the studied populations revealed a tendency in the two species to show the same seasonal responses with a bi-modal frequency. The higher peaks fall in spring and autumn (figs. 1, 2, 4), indicating a direct correlation with external humidity and an inverse correlation (partial) with both the external temperature and the availability of prey inside the cave. During the dry season, the two species also seek humid retreats, in which peaks of activity may be seen in the summer, involving the whole population (N_i , figs. 1, 2, 4) and directly correlated to both the internal and external temperature and, in part, to the availability of prey within the cave (tab. 2). The exception represented by the *S. ambrosii* population inhabiting site 3, suggests that a bi-modal behavioural response may be observed also inside the caves (N_i) if the hypogean retreat is scarcely efficacious (i.e., if internal conditions do not differ significantly from the external ones). This site, in fact, presents unfavourable microclimatic conditions and is characterised by thermophilous vegetation, mainly Mediterranean maquis. The summer refuge is, moreover, a cave with a wide entrance that makes it impossible for a constant level of humidity to be maintained or for a high summer density of

flies or other invertebrates to persist within the cave. Such adverse conditions are not present in the other studied sites, all of which occur in mesic environments characterised by deciduous woods furnishing thick cover (CIMMARUTA *et al.* 1999). Also the distribution of the *Speleomantes* observed within the caves confirms the use of such habitats on the basis of their suitability, with the frequency of individuals decreasing from the entrance and following a “zoning” pattern according to environmental and trophic parameters (SALVIDIO *et alii* 1994; SALVIDIO & PASTORINO 2002; FORTI 1998; CIMMARUTA *et alii* 1999; PASTORELLI *et alii* 2001; our unpublished data).

The numerical peak observed during summer inside caves was mainly due to the high abundance of juveniles, which also represent the population component subject to seasonal influences. The numerical variations shown by adults should probably not be interpreted only as a response to seasonal environmental variations, but could also be determined by reproductive behaviour causing them to associate in high density at the beginning of the summer. This applies especially to the pregnant females, maybe due to eggs laying which is likely to begin in late autumn (DURAND 1970, 1973; SALVIDIO *et alii* 1994).

Our data on movements of single specimens showed a different frequency of individuals observed within and outside the cave in different seasons. Also, the recapture of the same specimens either inside either outside the cave confirms that salamanders perform different behavioural strategies under different environmental conditions. This confirms the existence of a single salamander population in each site, a portion of which moves daily or seasonally between the cave and the outside. Finally, our observations support the already advanced hypothesis that competitive interaction for space, to be used as a refuge, may exist between *S. strinatii* and *S. ambrosii* when in sympatry (CIMMARUTA *et alii* 1999), since these species share the same general ecological requirements.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the many people involved in the field survey and in data analysis, they all provide an invaluable help: Gianni Amori, Rossella Cianchi, Cristian Di Camillo, Paolo Fabiani, God-

frey Hewitt, Marcello Iaconelli, Benedetto Lanza, "il Marietto", Andrea Nascetti, Vincenzo Petrarca, Lucia Rovelli, Andrea Ungaro and Stefano Zoia.

REFERENCES

- BOBKA M.S., JAEGER R.G. & MACNAUGHT D.C., 1981 - Temperature dependent assimilation efficiencies of two species of terrestrial salamanders - *Copeia*, Lawrence, 1981: 417-421.
- CIMMARUTA R., FORTI G., NASCETTI G. & BULLINI L., 1999 - Spatial distribution and competition in two parapatric sibling species of European plethodontid salamanders - *Ecol., Ethol. & Evol.*, Firenze, 11: 383-398.
- DURAND, J.-P., 1970 - Fortpflanzung und Entwicklung von *Hydromantes*, dem Höhlenmolch - *Aqua Terra*, 7 (4): 42-48.
- DURAND, J.-P., 1973 - L'Hydromante. Reproduction et Développement - *Compt. rend. Quatre-vingt-seizième Congr. Nat. Soc. Sav.*, Sect. Sc., Toulouse, 3: 267-277.
- FEDER M.E., 1983 - Integrating the ecology and physiology of plethodontid salamanders - *Herpetologica*, Emporia, 39: 291-310.
- FORTI G., 1998 - Parapatria, competizione ed isolamento riproduttivo in specie gemelle del genere *Hydromantes* - Tesi di dottorato di ricerca in Ecologia, XI Ciclo, Università degli studi di Parma, Anno Accad. 1997-98, 62 pp.
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G. & BULLINI L., 1997 - Parapatria e competizione in plethodontidi del genere *Hydromantes* - *Atti S. it. E.*, Parma, 18: 121-124.
- FORTI G., CIMMARUTA R., NASCETTI G., LANZA B. & BULLINI L., 1998 - Glaciazioni del quaternario e microevoluzione delle popolazioni continentali del genere *Hydromantes* (Amphibia, Plethodontidae) - *Biogeographia*, Siena, 19 (1997): 197-211.
- HAIRSTON N.G., 1987 - Community ecology and salamander guilds - Cambridge Univ. Press, 230 pp.
- JAEGER R.G., 1980 - Fluctuations in prey availability and food limitation for a terrestrial salamander - *Oecologia*, Berlin, 44: 335-341.
- LANZA B., 1946 - L'*Hydromantes* Gistel in Toscana e notizie sui suoi costumi (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) - *Arch. zool. ital.*, Napoli, 31: 219-237.
- LANZA B., 1999 - Plethodontidae - Lungenlose Salamander (pp. 77-204) - In: GROSSENBACHER K. & THIESMEIER B. (Eds.), Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 4/1: Schwanzlurche (Urodela) I. Aula Verlag, Wiesbaden, 408 pp.
- LANZA B., CAPUTO V., NASCETTI G. & BULLINI L., 1995 - Morphologic and genetic studies on the European plethodontid salamanders: taxonomic inferences (genus *Hydromantes*) - *Monogr. Mus. reg. Sci. nat.*, Torino, 16, 368 pp.
- NASCETTI G., CIMMARUTA R., LANZA B. & BULLINI L., 1996 - Molecular taxonomy of European Plethodontid Salamanders (Genus *Hydromantes*) - *J. Herpet.*, New Haven, 30 (2): 161-183.

- PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D., 2001 - Studi preliminari sull'ecologia di *Speleomantes italicus* (Dunn, 1923) nell'Appennino tosco-romagnolo (Caudata: Plethodontidae) - *Piamura*, Cremona, 13: 347-351.
- SALVIDIO S., 1991 - Habitat ed attività stagionale delle popolazioni interstiziali di *Speleomantes ambrosii* nell'alta Val Bisagno (Liguria centrale). (Amphibia, Plethodontidae) - *Riv. piem. St. nat.*, Carmagnola, 12: 69-74.
- SALVIDIO S. & PASTORINO M.V., 2002 - Spatial segregation in the European plethodontid *Spelomantes strinatii* in relation to age and sex - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 23: 505-510.
- SALVIDIO S., TAVANO M., LATTES A., MELODIA F. & PASTORINO M.V., 1994 - Ecology of a *Speleomantes ambrosii* population inhabiting an artificial tunnel - *Amphibia-Reptilia*, Leiden, 15: 35-45.
- STEFANI R., 1969 - La distribuzione geografica e l'evoluzione del geotritone sardo (*Hydromantes genei* Schleg.) e del geotritone continentale europeo (*Hydromantes italicus* Dunn) - *Arch. zool. ital.*, Napoli, 53 (1968): 207-244.

ABSTRACT

Two populations of *Speleomantes strinatii* and two of *S. ambrosii* have been studied between 1990 and 1997 to determine their ecological and behavioural responses related to the changes in temperature and humidity. Each studied site presented a cave and neighbouring stone walls easy to be checked for salamanders presence or absence. The number of specimens recorded and their behaviour resulted to be different in different seasons and related to the values of temperature and humidity and to the availability of prey both within and outside the caves.

The cave was used as a retreat, mainly during the summer, providing favourable values of temperature and humidity and prey availability. When external conditions were favourable (spring and autumn, mainly) a large part of the specimens (both young and adult) moved outside. If the cave is poorly efficacious as a retreat and is placed in a xeric, less suitable environment there is no difference between the activity observed within and outside, as in the case of a *S. ambrosii* population living in a site with a Mediterranean habitat and a wide-opening small cave.

RIASSUNTO

Risposte comportamentali e variazioni stagionali di parametri autoecologici in popolazioni di *Speleomantes strinatii* (Aellen, 1958) e *S. ambrosii* (Lanza, 1955) (Amphibia, Plethodontidae).

Le risposte ecologiche e comportamentali che le popolazioni di *Speleomantes* attuano in risposta ai cambiamenti di diversi parametri ambientali (soprattutto umidità e temperatura) sono state studiate dal 1990 al 1997 in due siti abitati da *S. strinatii* e in due da *S. ambrosii*. Nei quattro siti è stato rilevato un ciclo stagionale del numero di individui attivi, correlato a temperatura, umidità relativa e disponibilità di risorse trofiche, tanto nella porzione epigea che ipogea (grotta) del sito abitato.

In particolare, la parte ipogea del sito rappresenta un rifugio che viene utilizzato più frequentemente in estate per sfuggire alle condizioni stagionali avverse se

mantiene un sufficiente tenore di umidità e disponibilità di insetti predabili. Con condizioni ambientali favorevoli si assiste allo spostamento all'esterno di almeno una parte degli individui di tutte le classi d'età, con picchi di attività superficiale all'esterno in primavera e autunno. Se il rifugio ipogeo a disposizione risulta poco efficace, come nel caso della popolazione di *S. ambrosii* localizzata in un ambiente tipicamente mediterraneo, si osserva un'attività superficiale interna simile a quella esterna, con un utilizzo del rifugio meno marcato in estate e con picchi di attività primaverili e autunnali.

GRUPPI E FORME NUOVE DESCRITTI NEL PRESENTE VOLUME

AMPHIBIA

Urodela

P l e t h o d o n t i d a e

Speleomantes ambrosii bianchii Lanza, Cimmarruta,
Forti, Bullini & Nascetti, n. ssp. 67

CESTODA

Cyclophyllidea

N e m a t o t a e n i i d a e

Distoichometra italica Buriola, Pastorino & Bona, n. sp. . 82

INDICE

	Pag.
BURIOLA E., PASTORINO M. V. & BONA F. - Res Ligusticae CCXLVII. <i>Distoichometra italica</i> n. sp. (Cestoda, Nematotaeniidae) parassita del geotritone europeo <i>Speleomantes strinatii</i> (Aellen, 1958) in Liguria (28.XII.2005).....	79-97
CASALI S., SUZZI VALLI A., BUSIGNANI G. & TEDALDI G. - I costumi arboricoli di <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923) nella Repubblica di San Marino (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).....	145-152
CIMMARUTA R., FORTI G., LANZA B. & NASCETTI G. - Res Ligusticae CCXLVIII. The effects of Quaternary glaciations on the genetic structure of <i>Speleomantes strinatii</i> (Aellen, 1958) (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).....	109-121
DELFINO M., RAZZETTI E. & SALVIDIO S. - European Plethodontids: palaeontological data and biogeographical considerations (Amphibia) (28.XII.2005).....	45-58
FORTI G., CIMMARUTA R. & NASCETTI G. - Behavioural responses to seasonal variations of autoecological parameters in populations of <i>Speleomantes strinatii</i> (Aellen, 1958) and <i>S. ambrosii</i> (Lanza, 1955) (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).....	179-192
FORTI G., LANZA B., CIMMARUTA R. & NASCETTI G. - An experiment of artificial syntopy <i>ex situ</i> between <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923) and <i>S. ambrosii ambrosii</i> (Lanza, 1955) (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).	123-133
LAGHI P., PASTORELLI C. & SCARAVELLI D. - Individual pattern recognition of <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923) (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).	153-160
LANZA B. - Opening Speech (28.XII.2005).....	19-20
LANZA B. - Prolusione (28.XII.2005).	17-18

	Pag.
LANZA B., CIMMARUTA R., FORTI G., BULLINI L. & NASCETTI G. - Bianchi's cave salamander, <i>Speleomantes ambrosii bianchii</i> n. ssp. (Amphibia, Caudata, Plethodontidae) (28.XII.2005).....	59-77
ONETO F. & SALVIDIO S. - Res Ligusticae CCXLIX. Dati preliminari sulla distribuzione delle prede di <i>Speleomantes strinatii</i> (Aellen, 1958) nella Stazione Biospeleologica di S. Bartolomeo (GE) (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).	161-168
PASTORELLI C., LAGHI P. & SCARAVELLI D. - Spacing of <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923): application of a Geographic Information System (G.I.S.) (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).....	169-177
PASTORINO M. V. - Gruppo "Issel": ideali e storia (28.XII.2005).	21-30
POGGI R. - La figura di Arturo Issel (1842-1922) (28.XII.2005).	31-37
POGGI R. - Note d'archivio sulla fondazione del Gruppo "Issel" (28.XII.2005).....	39-43
RUGGI A., CIMMARUTA R., FORTI G. & NASCETTI G. - Preliminary study of a hybrid zone between <i>Speleomantes italicus</i> (Dunn, 1923) and <i>S. ambrosii</i> (Lanza, 1955) on the Apuan Alps, using RFLP analysis (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005).....	135-144
SALVIDIO S., POGGI R., DORIA G. & PASTORINO M.V. - Prefazione (28.XII.2005).....	9-11
UVA B. M., STURLA M. & MASINI M. A. - Kidney and osmoregulation in <i>Speleomantes genei</i> (Temminck & Schlegel, 1838) (Amphibia, Plethodontidae) (28.XII.2005)	99-107

REGISTRATO AL TRIBUNALE DI GENOVA AL N. 74 IN DATA 17 giugno 1949
DOTT. ROBERTO POGGI - *DIRETTORE RESPONSABILE*

Finito di stampare nel mese di dicembre 2005
PRINTED IN ITALY

NORME PER GLI AUTORI

Gli *Annali del Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria"*, fondati nel 1870, e *Doriana*, fondato nel 1949, sono periodici scientifici su cui vengono pubblicati lavori originali ed inediti di argomento naturalistico. Sono preferiti i contributi di taglio sistematico basati su materiali appartenenti alle collezioni del Museo di Genova; sono esclusi gli articoli divulgativi o di scienze applicate.

Tutti i lavori - redatti in italiano, inglese, francese, spagnolo o tedesco, ma con preferenza per le prime due lingue - devono essere inviati alla Direzione del Museo (Via Brigata Liguria 9, 16121 Genova), che si riserva di sottoporli al giudizio di consulenti ed esperti e di decidere circa la accettazione e la successiva stampa sugli *Annali* o su *Doriana*.

Il testo del lavoro deve essere presentato su supporto informatico IBM compatibile (dischetto da 3,5") e in due copie stampate su fogli numerati di formato A4, scritti su una sola facciata, con doppia spaziatura e con margini di almeno cm 2,5.

Lo schema da adottare è il seguente: nome e cognome per esteso dell'Autore o degli Autori, con indirizzo in nota a pie' di pagina; titolo, con indicazione fra parentesi del gruppo sistematico trattato; testo, scritto in modo conciso, chiaro e secondo le consuete norme della letteratura scientifica; eventuali ringraziamenti; bibliografia e in ultimo riassunto in due lingue, comprensivo di traduzione del titolo nella seconda lingua (nel caso di testi in italiano è raccomandato un Abstract in inglese, nel caso di testi in lingua straniera è obbligatorio un riassunto in italiano).

I riferimenti relativi al materiale appartenente al Museo di Genova devono essere indicati con la sigla MSNG, seguita eventualmente dal numero di catalogo.

Si raccomanda di non apporre sottolineature, di non usare grassetti e di scrivere in corsivo esclusivamente i nomi generici, specifici e sottospecifici.

I riferimenti bibliografici vanno compilati secondo i seguenti esempi:

GESTRO R., 1924 - Contributo allo studio dei Paussidi della Somalia - *Boll. Soc. ent. ital.*, Genova, 56, (2): 17-19. [nel caso di un articolo su un periodico]

BINAGHI G., 1950 - Coleotteri d'Italia. Vita, ambienti, utilità, mezzi di lotta - Ed. Briano, Genova, 210 pp., 104 figg. [nel caso di un'opera monografica]

CAPRA F., 1987 - Italian and European Dermaptera of the museums of Florence and Milan studied by H. Steinmann (pp. 157-173) - In: Baccetti B. (ed.), *Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects*, E. Horwood Ltd., Chichester, 612 pp. [nel caso di un capitolo di un volume]

I titoli dei periodici (in corsivo) vanno abbreviati secondo l'uso consueto e la città di pubblicazione va sempre indicata (in tondo) se non è già compresa nel titolo stesso.

Le figure devono essere inviate in originale cartaceo e in copia (aggiungendo anche, se disponibile, la versione su supporto informatico), separate dal testo, numerate progressivamente e già composte in modo da rispettare, con le possibili riduzioni, la giustezza della pagina: altezza massima 17,5 cm, comprensivi della didascalia, e larghezza massima 11 cm; le didascalie devono essere raggruppate su fogli separati dal testo.

Il numero delle tabelle e delle figure deve essere limitato allo stretto necessario; le spese per la riproduzione e la stampa di tavole a colori sono a totale carico degli Autori, così come quelle per le immagini in bianco e nero se il lavoro non tratta materiale del Museo di Genova. Gli Autori possono indicare sul testo la posizione preferita delle illustrazioni; la Redazione si riserva comunque la facoltà di apportare modifiche nella distribuzione e nel formato di tabelle e figure.

Gli Autori riceveranno di norma una sola bozza, da correggere e restituire alla Redazione a stretto giro di posta; nel caso di più Coautori le bozze saranno inviate solo al primo, che dovrà farsi carico di inviarne copia ai colleghi. Nelle bozze sono ammesse soltanto correzioni degli errori di stampa; ogni altra modifica al testo originario sarà addebitata all'Autore.

Per ogni articolo sono concessi 30 estratti gratuiti, che, nel caso di più Coautori, saranno inviati al primo Autore; nel licenziare le bozze gli Autori indicheranno l'eventuale numero di estratti in più che desiderano sia stampato a loro spese.

Testi e figure dei lavori non conformi alle presenti norme verranno restituiti agli Autori per le necessarie modifiche, effettuate le quali potranno essere presi in considerazione dalla Redazione.

STAMPA PERIODICA BIENNALE

